

BEST AVAILABLE COPY

PCT/KR 03/00921

RO/KR 22.05.2003

RECD 06 JUN 2003

PO PCT

대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2002-0025522
Application Number

출원년월일 : 2002년 05월 09일
Date of Application MAY 09, 2002

출원인 : 주식회사 펄트론
Applicant(s) PEPTRON CO., LTD

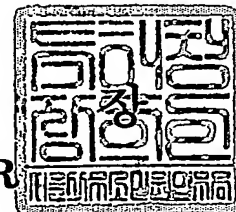
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



2003 년 05 월 16 일

특허청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.05.09
【발명의 명칭】	서방성 단백질 약물 및 그 제조방법
【발명의 영문명칭】	Sustained release formulations of proteins and preparing method thereof
【출원인】	
【명칭】	주식회사 펙트론
【출원인코드】	1-1999-037067-2
【대리인】	
【명칭】	특허법인 원전
【대리인코드】	9-2000-100001-9
【지정된변리사】	이택순 , 강성혜
【포괄위임등록번호】	2000-055124-6
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이희용
【성명의 영문표기】	LEE, Hee Yong
【주민등록번호】	650404-1025627
【우편번호】	305-728
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 462-5 세종아파트 110-1003
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김정수
【성명의 영문표기】	KIM, Jung Soo
【주민등록번호】	760305-1489910
【우편번호】	305-804
【주소】	대전광역시 유성구 신성동 119-7번지 201호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이지숙
【성명의 영문표기】	LEE, Ji Suk
【주민등록번호】	760519-2117819

【우편번호】	305-804
【주소】	대전광역시 유성구 신성동 144-6번지 206호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김정인
【성명의 영문표기】	KIM, Jung In
【주민등록번호】	790820-2528811
【우편번호】	305-390
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 286-6번지 정빌라 105호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	서윤미
【성명의 영문표기】	SEO, Yun Mi
【주민등록번호】	791014-2478717
【우편번호】	330-810
【주소】	충청남도 천안시 직산면 직산읍 삼은3구 76-70
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	임채진
【성명의 영문표기】	LIM, Chae Jin
【주민등록번호】	760201-1167614
【우편번호】	305-345
【주소】	대전광역시 유성구 신성동 126-12 301호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박보형
【성명의 영문표기】	PARK, Bo Hyung
【주민등록번호】	750316-2670219
【우편번호】	705-773
【주소】	대구광역시 남구 이천동 상아맨션 101-1207
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

김성규

【성명의 영문표기】

KIM, Sung Kyu

【주민등록번호】

660212-1117816

【우편번호】

305-390

【주소】

대전광역시 유성구 전민동 464-1 엑스포아파트 103-1609

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

정영환

【성명의 영문표기】

JUNG, Young Hwan

【주민등록번호】

671214-1105216

【우편번호】

306-050

【주소】

대전광역시 대덕구 중리동 178-4

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

장승구

【성명의 영문표기】

CHANG, Seung Gu

【주민등록번호】

660217-1056818

【우편번호】

305-390

【주소】

대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 211-1603

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

최호일

【성명의 영문표기】

CHOI, Ho Il

【주민등록번호】

660928-1067323

【우편번호】

305-345

【주소】

대전광역시 유성구 신성동 한울아파트 107-1303호

【국적】

KR

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대
리인 특허법인 원
전 (인)

【수수료】

【기본출원료】

20

면

29,000 원

【가산출원료】

39

면

39,000 원

1020020025522

출력 일자: 2003/5/17

【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	0 항	0 원
【합계】	68,000 원	
【감면사유】	소기업 (70%감면)	
【감면후 수수료】	20,400 원	
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 소기업임을 증명하는 서류_1통	

【요약서】**【요약】**

본 발명은 활성성분으로 단백질 약물을 함유하는 서방성 제형의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의한 단백질 함유 서방성 제형은 활성 성분인 단백질 약물이 황산 다당류와 복합체를 이루어 안정화된 상태에서 리피드와 같은 소수성 물질이 감싸고 있는 형태를 이루고 있다. 본 발명에 의하여 제조된 단백질 약물 함유 서방성 제형은 체내에 투여되었을 때 일정기간 동안 단백질 약물을 유효농도로 지속적으로 방출함으로써, 주사에 의한 약물의 투여 횟수를 줄이면서 효과적으로 질병을 치료하는 데 사용될 수 있다.

【대표도】

도 14

【색인어】

단백질, 서방성, 제형, 황산 다당류, 리피드, 소수성 물질

【명세서】

【발명의 명칭】

서방성 단백질 약물 및 그 제조방법{Sustained release formulations of proteins and preparing method thereof}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 pH 4.0에서 소 혈청 알부민과 덱스트란 황산(분자량: 2,500)의 비율별 복합체 형성 시험 결과를 나타낸다.

도 2는 pH 4.0에서 소 혈청 알부민과 덱스트란 황산(분자량: 4,000)의 비율별 복합체 형성 시험 결과를 나타낸다.

도 3은 pH 4.0에서 소 혈청 알부민과 덱스트란 황산(분자량: 25,000)의 비율별 복합체 형성 시험 결과를 나타낸다.

도 4는 pH 4.0에서 소 혈청 알부민과 콘드로이틴 황산의 비율별 복합체 형성 시험 결과를 나타낸다.

도 5는 pH 4.0에서 알파-락트 알부민과 덱스트란 황산(분자량: 4,000)의 비율별 복합체 형성 시험 결과를 나타낸다.

도 6은 pH 4.0에서 오브알부민과 덱스트란 황산(분자량: 4,000)의 비율별 복합체 형성 시험 결과를 나타낸다.

도 7은 pH 4.0에서 인간 성장 호르몬과 덱스트란 황산(분자량: 2,500)의 비율별 복합체 형성 시험 결과를 나타낸다.

도 8은 pH 4.0에서 인간 성장 호르몬과 덱스트란 황산(분자량: 4,000)의 비율별 복합체 형성 시험 결과를 나타낸다.

도 9는 pH 4.0에서 인간 성장 호르몬과 콘드로이틴 황산의 비율별 복합체 형성 시험 결과를 나타낸다.

도 10은 인간 성장 호르몬과 덱스트란 황산(분자량: 4,000)의 일정 비율에서 pH에 따른 복합체 형성 시험 결과를 나타낸다.

도 11은 인간 성장 호르몬과 콘드로이틴 황산의 일정 비율에서 pH에 따른 복합체 형성 시험 결과를 나타낸다.

도 12a, 도 12b 및 도 12c는 인간 성장 호르몬과 덱스트란 황산(분자량: 4,000) 복합체의 pH에 따른 가역적 복합체 형성을 확인한 결과를 나타낸다. 도 12a는 인간 성장 호르몬 비교액의 크로마토그램을 나타내고, 도 12b는 인간 성장 호르몬과 덱스트란 황산(분자량: 4,000)을 10 mM 암모늄 아세테이트 pH 3.0 완충액에서 30분간 반응 후 원심분리하여 취한 상층액의 크로마토그램이다. 도 12c는 침전된 인간 성장 호르몬과 덱스트란 황산의 복합체에 10 mM 수산화나트륨 용액을 가하여 pH 7.0으로 조정된 SEC 크로마토그램을 나타낸다.

도 13은 등전점 이하의 pH에서 인간 성장 호르몬과 덱스트란 황산 복합체의 황산 다당류에 의한 단백질 안정화 효과에 대한 시험 결과를 나타낸다.

도 14는 황산 다당류와 단백질의 복합체를 함유하는 미세 입자 제형들의 체외 방출 시험 결과를 나타낸다.

도 15는 황산 다당류를 포함하지 않고 단백질만을 함유하는 미세 입자 제형들의 체외 방출 시험 결과를 나타낸다.

도 16a는 인간 성장 호르몬 표준액, 도 16b는 실시예 7에 의해 제조된 서방성 입자에서 추출된 인간 성장 호르몬, 도 16c는 체외 방출 시험 5일 후 남아있는 제형으로부터 추출된 인간 성장 호르몬의 SEC 크로마토그램이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <17> 본 발명은 체내에서 단백질 약물이 생물학적 활성을 유지하면서, 지속적이고 균일하게 체내로 방출될 수 있도록 제재화된 서방성 제형 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.
- <18> 본 명세서 및 청구범위에서 "단백질 약물"이라 함은 단백질 또는 펩타이드 또는 이를 주요성분으로 함유하는 약물을 포괄하는 의미로, "단백질"이라 함은 단백질 또는 펩타이드를 포괄하는 의미로 사용한다.
- <19> 단백질 약물은 대다수가 구강 투여시 위의 산성 환경 하에서 활성 구조를 잃게 되거나 효소적 분해로 인하여 파괴되고 또한 위 또는 장 점막에서 흡수되는 비율도 상당히 낮다. 이로 인해 대부분의 단백질 약물은 비경구 투여, 즉 정맥주사, 피하주사, 근육주사 등의 방법으로 투여되는데 이러한 경로로의 투여 후에도 생체 내에서의 짧은 반감기로 인해 반복적으로 계속 주사하여야 한다. 특히 단백질 약물의 경우 수개월 동안의 장기간 투여를 필요로 하는 경우가 많아 생체 분해성 고분자를 이용한 지속성, 서방성 제

형 연구가 활발히 진행되고 있다(Heller, J. *et al.*, *Biomaterials*, 4, 262-266 (1983); Langer, R., *Science*, 249, 1527-1533 (1990); Okada, H. and Toguchi, H., , 12, 1-99 (1995)).

<20> 단백질 약물의 서방성 주사 제형에 가장 많이 사용되어진 생체 분해성 고분자로는 폴리락타이드(Polylactide, PLA), 폴리글라이콜라이드(Polyglycolide, PGA)와 이들의 공중합체인 폴리(락타이드-코-글라이콜라이드)(Poly(lactide-co-glycolide), PLGA) 등의 폴리에스테르(Polyester) 계열의 합성 고분자이다(DeLuca, P. P. *et al.*, *Biodegradable polyesters for drug and polypeptide delivery*, in: El-Nokaly, M. A., Piatt, D. M., and Charpentier, B. A. (Eds.), *Polymeric delivery systems, properties and applications*, American Chemical Society, pp. 53-79 (1993); Park, T. G., *Biomaterials*, 16, 1123-1130 (1995); Anderson, J. M. and Shive, M. S., *Adv. Drug Del. Rev.*, 28, 5-24 (1997); Tracy, M. A. *et al.*, *Biomaterials*, 20, 1057-1062 (1999)).

<21> 이러한 폴리 에스테르 계열의 합성 고분자 이외에도 지질, 지방산, 왁스 및 그들의 유도체를 포함하는 리피드류, 알부민, 젤라틴, 콜라젠, 피브린 등의 단백질류, 알긴산, 키틴, 키토산, 덱스트란, 히알루론산, 전분 등의 다당류의 천연 고분자 등이 단백질 약물의 서방성 제형의 매트릭스로 많이 연구 되고 있다. 상기의 고분자 중에서 단백질류, 다당류는 수용성이기 때문에 이들이 단백질 약물의 서방성 매트릭스로 사용될 때 수일 또는 수주 이상으로 단백질 약물의 서방출성을 제공하기가 상당히 어렵다. 이에 반하여 폴리에스테르 계열의 합성 고분자나 리피드류의

경우에는 수불용성이기 때문에 이들을 매트릭스로 사용할 경우, 수일, 수주 또는 수개월 동안 단백질 약물의 서방출성을 제공할 수 있다.

<22> 그러므로 본 발명에서는 특히 폴리에스테르 계열의 합성 고분자와 리피드류와 같이 수불용성인 고분자를 이용한 단백질 약물 함유 서방성 제형에 관하여 연구하고자 하였다

<23> 단백질 약물을 상기의 폴리에스테르류, 리피드류와 같은 고분자 매트릭스 내로 포획할 수 있는 방법은 코아세르베이션 또는 유탁액 상분리, 분무 건조에 의한 캡슐화 및 유기 또는 수상 중의 용매 증발법 등이 이용될 수가 있다(McGee, J. P. *et al.*, *J. Controlled Rel.*, 34, 77-86 (1995); Gander, B. *et al.*, *J. Microencapsul.*, 12, 83-97 (1995); O'Donnell, P. B. and McGinity, J. W., *Adv. Drug Del. Rel.*, 28, 25-42 (1997)). 대부분의 단백질 약물은 수용성이기 때문에 상기 방법 중에서도 이중 에멀전 용매 증발법 (W/O/W 또는 double emulsion solvent evaporation)이 단백질 약물 함유 서방성 미세 입자 제조에 많이 이용되어 왔다. 이 방법은 단백질 또는 수용성 약물이 용해되어 있는 수용액상을 생체 분해성 고분자가 용해되어 있는 유기용매 상에 가한 후 초음파분쇄기 또는 호모게나이저 등의 기구를 사용하여 일차 에멀전을 만든 후 이를 폴리비닐알코올 등의 계면 활성제를 함유하는 2차 수용액상에 분산시킴으로써 이차 에멀전을 만든다. 이 시스템에 가열 또는 감압 조건을 가하여 유기용매를 제거하면 고분자가 고형화되면서 미세 입자가 되고 이 입자들을 원심분리 또는 여과 등의 방법으로 회수한 후 동결 건조하여 단백질 약물이 함유된 생체 분해성 미세 입자를 얻게 된다. 그렇지만, 이

러한 미세 입자 제조 과정에서 단백질 약물이 수용액과 유기용매의 경계면에 위치하고 초음파 분쇄 또는 호모게나이제이션 등의 가혹 조건에서 단백질의 변성, 비가역적 응집 현상들이 일어나게 된다. 결과적으로 이렇게 해서 만들어진 미세 입자로부터 단백질은 전체 약물의 수습 %가 초기 파다 방출되고 이어 수일 내지 수십일간 거의 방출되지 않다가 후기에 약간 방출량이 증가하는 경향을 보인다(Kim, H. K. and Park, T. G., , 65, 659-667 (1999); Crotts, G. and Park, T. G., , 15, 699-713 (1998)).

<24> 그리하여, 최근에는 주로 단백질을 생체 분해성 고분자 내로 포획하는 과정 중에 나타나는 단백질의 변성과 비가역적 응집현상을 최소화하려는 연구가 활발히 이루어져 왔다. 이러한 연구의 일환으로 단백질의 수용성 용액에 안정화제를 첨가하는 방법이 있는데 트리할로오스, 만니톨, 텍스트란, 폴리에틸렌글리콜 등을 사용함으로써 단백질이 어느 정도 안정화된다는 사실이 보고되었다(미국 특허 제 5,804,557호; Cleland, J. L. and Jones, A. J. S.,

Pharm. Res., 13, 1464-1475 (1996); Cleland, J. L. *et al.*, *Pharm. Res.*, 14, 420-425 (1997); Pean, J. M. *et al.*, *Pharm. Res.*, 16, 1294-1299 (1999); Sanchez, A. *et al.*, *Int. J. Pharm.*, 185, 255-266 (1999); Lavelle, E. C. *et al.*, *Vaccine*, 17, 516-529 (1999)). 이러한 안정화제들은 단백질 주변에 수화층을 형성함으로써 단백질과 유기용매와의 상호작용을 줄여 단백질의 변성 및 비가역적 응집을 어느 정도 막아준다. 이와는 다른 노력으로 단백질 약물을 수용액에 용해시키는 대신 분말 상태로 바로 유기용매에 균일 상태로 분산시킴으로써 제조 과정 중에 단백질의 변성을 최소화하기도 하였다 (Cleland, J. L. and Jones, A. J. S., Stable formulations of recombinant human growth hormone and interferon- γ for microencapsulation in biodegradable microspheres, 13, 1464-1475 (1996); Iwata, M. *et al.*, *J. Microencapsul.*, 16, 49-58 (1999)).

<25> 상기 언급한 방법 중 특히 후자에 언급한 단백질 분말을 이용하는 방법은 최근 인간 성장 호르몬을 폴리에스테르 계열인 폴리(락타이드-코-글라이코라이드) 고분자 내로 포획하여 제조한 인간 성장 호르몬의 서방성 제형인 Lutropin Depot™라는 상품명으로 미국 FDA에서 허가 받은 바 있다. 이 제품은 금속이온(Zn^{2+})으로 안정화된 인간 성장 호르몬의 분말을 폴리(락타이드-코-글라이코라이드) 고분자가 용해되어 있는 메칠렌클로라이드 용매에 분산시킨 후 에탄올을 함유하는 액체질소에 분무한 후 저온에서 에탄올을 이용하여 메칠렌클로라이드 용매를 제거하여 서방성 미립구 제형을 제조함으로써 제조 과정 중에 단백질 약물의 변성을 최소화하였다(미국 특허 제 5,019,400호, 제 5,654,010호).

<26> 하지만 최근의 논문에서 이 서방성 제형이 기존의 주사 제형에 비해서 생체 이용률이 상대적으로 매우 낮음(33-55%)이 보고된 바 있다(Cleland, J. L. et al., *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 212-210 (2001)). 이러한 Lutropin DepotTM의 낮은 생체 이용률은 이 제형에서 인간 성장 호르몬의 초기 방출이 상대적으로 너무 높은 것이 한 원인이 될 수 있으며 또한 사용된 고분자, 즉 폴리(락타이드-코-글라이코락타이드)의 생체 분해속도가 너무 느려(수주 또는 수개월), 생체 내에 투여된 후 단백질이 오랜 기간 동안 방출되지 못함으로 변성되었을 가능성도 있음을 시사하고 있다.

<27> 이와 같은 보고들에서 알 수 있듯이 현재까지 단백질 약물을 수불용성인 고분자 매트릭스 내로 안정한 상태로 포획하면서 초기 과다 방출 없이 수일 또는 수주 이상으로 서방출성을 제공하는 것은 기술적으로 상당히 어려운 과제라 할 수 있다.

<28> 그리하여, 본 발명에서는 기존에 주로 사용되던 폴리에스테르 계열의 생체 분해성 고분자를 사용하는 대신, 리피드와 같은 소수성 물질을 매트릭스로 사용하여 단백질 약물을 안정화된 상태로 포획하고, 단백질 약물이 초기 과다 방출 없이 수일간 일정 속도로 서서히 방출되게 하는 단백질 약물 함유 서방성 제형의 제조 방법을 제시하고자 하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<29> 본 발명의 목적은 활성 성분인 단백질 약물을 함유하는 생체 분해성 고분자로 이루어진 서방성 제형의 제조 방법을 제공하는 것이다.

<30> 본 발명의 더욱 중요한 목적은 단백질 약물을 생체 분해성 고분자, 그 중에서도 특히 리피드와 같은 고분자 내로 포획할 때에 단백질 약물이 안정한 상태로 유지되게 하면서 초기 과다 방출 없이 수일 동안 일정 속도로 서서히 방출되게 하는 서방성 제형의 제조 방법을 제공하고자 하는 것이다.

<31> 본 발명의 또 다른 목적은 이러한 상기의 목적을 달성할 수 있도록 황산 다당류와 복합체를 이룬 단백질 약물을 리피드와 같은 소수성 물질로 둘러싸인 형태의 단백질 약물 함유 서방성 제형의 제조 방법을 상세히 제공하고자 하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<32> 상기의 목적을 달성하기 위한 단백질 함유 서방성 제형의 제조 과정은 단백질 약물과 황산 다당류의 혼합물을 제조하는 공정과 이 혼합물을 리피드와 같은 소수성 물질이 균일하게 용해되어 있는 용액에 분산시키는 공정과 이로부터 용매를 제거하여 고체상의 단백질 함유 서방성 제형을 제조하는 공정으로 이루어져 있다.

<33> 본 발명에서 "단백질 약물"이라 함은 단백질 또는 펩타이드 또는 이를 주요 활성성분으로 함유하는 약물을 포괄하는 의미이며, "단백질"이라 함은 단백질 또는 펩타이드를 포괄하는 의미로 사용한다. 본 발명에 유용하게 적용될 수 있는 단백질은 다음과 같은 예와 그들의 돌연변이체 또는 유사체 등이 있으며, 아래의 예들은 예시적인 것일 뿐 본 발명의 "단백질"의 범위가 이에 한정되지는 않는다. 즉, 본 발명의 "단백질"이라 함은 인간 성장 호르몬, 성장 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 펩타이드, 인터페론, 콜로니 자극 인자, 인터루킨, 마크로파지 활성 인자, 마크로파지 펩타이드, B세포 인자, T

세포 인자, 단백질 A, 알러지 억제 인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 괴사 인자, 종양 억제 인자, 전이 성장 인자, 알파-1 안티트립신, 알부민과 그 단편 폴리펩타이드, 아포리포단백질-E, 에리트로포이에틴, 인자 VII, 인자 VIII, 인자 IX, 플라즈미노젠 활성화 인자, 유로키나제, 스트렙토키나제, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라지나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 혈소판 유래 성장 인자, 표피 성장 인자, 오스테오제닉 성장 인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 인슐린, 아트리오펩틴, 카틸리지 유도 인자, 결합 조직 활성화인자, 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장 인자, 파라타이로이드 호르몬, 릴렉신, 씨크레틴, 조마토메딘, 인슐린-유사 성장 인자, 아드레노코르티코트로픽 호르몬, 글루카곤, 콜레시스토키닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출 인자, 타이로이드 자극 호르몬, 각종 바이러스, 박테리아, 독소 등에 대한 단일클론성 또는 폴리클론성 항체, 각종 바이러스 유래 백신 항원 등과 같은 것이다.

<34> 또한, 본 발명에서 "황산 다당류"라 함은 예컨대 텍스트란 황산, 콘드로이틴 황산, 더마탄 황산, 헤파린, 헤파란 황산, 케라탄 황산 등을 의미한다.

<35> 본 발명에 유용한 "소수성 물질"은 주로 리피드를 지칭하며, 좀더 구체적으로는 미리스트산, 팔미트산, 스테아릴산과 같은 지방산, 파모익산(pamoic acid), 글리세릴 미리스트레이트, 글리세릴 팔미테이트, 글리세릴 스테아레이트와 같은 모노아실 글리세롤, 소비탄 미리스트레이트, 소비탄 팔미테이트, 소비탄 스테아레이트와 같은 소비탄 지방산 에스테르, 다이아실 글리세롤, 트리미리스틴, 트리팔미틴, 트리스테아린과 같은 트리글리세라이드, 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜산, 포스파티딜세린, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜이노시톨, 카디오리핀과 같은 포스포리피드, 스펅고신, 세

라마이드, 스펡가닌과 같은 스펡고리피드, 왁스와 이들의 염 및 유도체가 포함되며, 이에 한정되지는 않는다.

<36> 본 발명에 있어서, "단백질 약물과 황산 다당류의 혼합물"이라 함은 단백질과 황산 다당류가 비공유성 결합 즉, 이온결합, 소수성 결합, 수소이온결합 등으로 결합되어 있는 상태 및 이와 같은 상호 작용 없이 물리적으로 혼재되어 있는 상태를 포함하는 용어로 사용된다. 이 혼합물의 상태는 수용액에 분산 또는 용해되어 있는 액체상태이거나 또는 건조과정을 통해 용매를 제거한 고체상의 분말이다.

<37> 앞서 언급한 바와 같이 단백질 약물이 생체 분해성 고분자 매트릭스 내에 안정화된 상태로 함유되어 있으며 체내에 투여되었을 때 초기 과다 방출 없이 지속적이고 일정한 속도로 단백질 약물이 방출되도록 하는 단백질 약물 함유 서방성 제형을 제조하는 방법은 기술적으로 상당한 어려움이 있었다. 본 발명자들은 이러한 문제점을 해결하고자 하여, 생체 내에 존재하는 단백질, 특히 인간 성장 호르몬과 같은 단백질이 어떻게 존재하고 있는가에 예의 주시하였다.

<38> 성장 호르몬, 프로락틴과 같은 단백질류 호르몬은 체내에서 합성된 후 분비 과립(secretory granules)이라는 소기관에 가역적 응집체 형태의 농축된 상태로 존재하고 있으며 외부 자극에 따라서 용해된 형태(soluble form)로 분비되는 것으로 알려져 있다(Dannies, P. S., *Molecular and Cellular Endocrinology*, 177, 87-93 (2001)). 프로락틴의 경우 분비 과립 내의 밀집 핵(dense cores) 상태에서의 단백질의 농도는 소포체(endoplasmic reticulum)에서의 농도의 200배 이상에 달하는 것으로 알려져 있다.

- <39> 본 발명자들은 이러한 단백질들이 어떻게 분비 과립 내에 매우 높은 농도의 농축된 상태로 존재하는가와, 이러한 응집체로 존재하고 있던 단백질이 어떻게 용해된 형태로 가역적으로 분비되는가를 이해하고자 하였고, 이와 유사한 소위, 인공 분비 과립 (artificial secretory granules)을 제조하는 방법을 찾고자 하였다. 이러한 인공 분비 과립 및 그의 제조 방법은 바로 본 발명자들이 본 발명에서 제시하고자 하는 서방성 단백질 약물 제형과 그 제조 방법의 핵심이라 할 수 있다.
- <40> 분비 과립의 개략적 조성을 살펴보면 헤파란 황산, 콘드로이틴 황산 등의 황산 다당류를 과량 함유하고 있으며, 아직 정확하게 밝혀지지 않은 열충격 단백질(heat shock protein)과 같은 샤페론(chaperone)을 또한 함유하고 있으며, 포스포리피드와 같은 지질막으로 둘러 싸여져 있다. 분비 과립의 분해 조건은 상당히 까다로우며, 현재까지는 알칼리 pH, 0.5% SDS에 의해 가장 잘 분해되는 것으로 알려져 있다.
- <41> 다시 말하면, 포스포리피드 지질막으로 둘러 싸여 있는 단백질의 농축 핵은 산성 pH 하에서 황산 다당류와 복합체를 이루고 있으며 샤페론의 존재로 인하여 단백질 간의 비가역적 응집을 막아주고 있음을 시사하고 있다. 본 발명자들은 이러한 현상을 이해하고 본 발명의 단백질 함유 서방성 제형을 완성할 수가 있었다.
- <42> 우선 본 발명자들은 단백질과 황산 다당류와의 복합체에 관한 연구를 하였다. 이러한 현상은 이미 잘 알려져 있으나 본 발명에서는 pH에 따른 단백질과 황산 다당류 복합체의 형성 여부, pH 변화에 따른 복합체의 가역성 여부, 리피드와 같은 소수성 물질로 감싸는 과정에서 야기될 수 있는 단백질의 변성 여부, 그리고 이렇게 제조된 최종 제형에서 단백질 약물이 과연 서방출성을 갖는지의 여부에 관하여 단계별로 연구를 하였고, 그 결과 본 발명을 완성하게 되었다. 단백질과 황산 다당류와의 복합체 시험에서 알 수

있듯이 단백질의 종류에 관계 없이 단백질의 등전점 이하의 pH에서는 단백질과 황산 다당류가 불용성 복합체를 형성함을 알 수 있었으며, pH를 단백질의 등전점 이상으로 조정하였을 경우, 불용성 복합체가 해리되면서 단백질이 변성되지 않은 원래의 상태로 되돌아감을 알게 되었다.

<43> 또한, 본 발명자들은 이러한 단백질과 황산 다당류 복합체를 리피드와 같은 소수성 물질로 이루어진 매트릭스로 둘러싸게 되면 단백질이 매트릭스로부터 서서히 일정 속도로 방출됨을 알게 되었다. 또한, 놀랍게도 단백질과 황산 다당류가 등전점(pI) 이상의 pH에서 복합체를 형성하지 않고 혼합된 상태로 존재하면서 소수성 매트릭스 물질로 둘러싸이더라도 서방출성을 제공하게 됨을 알 수 있었다.

<44> 본 발명을 다음의 시험예, 실시예, 및 비교예를 통하여 보다 상세히 설명하고자 한다.

<45> 우선, 단백질과 황산 다당류가 단백질의 등전점 이하의 pH에서 불용성 복합체를 형성함을 다음의 시험예를 통하여 확인 하였다. 이하 시험예에서 단백질의 양은 pH 7.0, 150 mM 염화 나트륨을 함유하는 10 mM 인산 완충액을 이동상으로 하고 유속 0.5ml/분, UV 215 nm에서 GS-320HQ 컬럼을 이용하여 크기배제 크로마토그래피(SEC)로 정량하였다.

<46> <시험예 1> 소 혈청 알부민과 덱스트란 황산의 복합체 시험

<47> 소 혈청 알부민과 덱스트란 황산(분자량: 2,500)을 10 mM 암모늄 아세테이트

완충액(pH 4.0)에서 1:0.01, 1:0.02, 1:0.05, 1:0.1, 1:0.2, 1:0.5, 1:1, 1:2 (w/w)의 비율로 섞었다. 이때 소 혈청 알부민의 최종농도는 0.1 mg/ml이었다. 이를 실온에서 30분간 방치한 후 원심분리하여 상층액을 취하였다. 취한 상층액을 SEC로 정량하여 텍스트란 황산과 복합체를 이루지 않은 소 혈청 알부민의 양을 계산하여 그 결과를 도 1에 나타내었다.

<48> <시험예 2> 소 혈청 알부민과 텍스트란 황산의 복합체 시험

<49> 소 혈청 알부민과 텍스트란 황산(분자량: 4,000)을 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 4.0)에서 1:0.01, 1:0.02, 1:0.05, 1:0.1, 1:0.2, 1:0.5, 1:1, 1:2 (w/w)의 비율로 섞었다. 이때 소 혈청 알부민의 최종농도는 0.1 mg/ml이었다. 이를 실온에서 30분간 방치한 후 원심분리하여 상층액을 취하였다. 취한 상층액을 SEC로 정량하여 텍스트란 황산과 복합체를 이루지 않은 소 혈청 알부민의 양을 계산하여 그 결과를 도 2에 나타내었다.

<50> <시험예 3> 소 혈청 알부민과 텍스트란 황산의 복합체 시험

<51> 소 혈청 알부민과 텍스트란 황산(분자량: 25,000)을 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 4.0)에서 1:0.01, 1:0.02, 1:0.05, 1:0.1, 1:0.2, 1:0.5, 1:1, 1:2 (w/w)의 비율로 섞었다. 이때 소 혈청 알부민의 최종농도는 0.1 mg/ml이었다. 이를 실온에서 30분간 방치한 후 원심분리하여 상층액을 취하였다. 취한 상층액을 SEC로 정량하여 텍스트란 황

산과 복합체를 이루지 않은 소 혈청 알부민의 양을 계산하여 그 결과를 도 3에 나타내었다.

<52> <시험예 4> 소 혈청 알부민과 콘드로이틴 황산의 복합체 시험

<53> 소 혈청 알부민과 콘드로이틴 황산을 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 4.0)에서 1:0.01, 1:0.02, 1:0.05, 1:0.1, 1:0.2, 1:0.5, 1:1, 1:2 (w/w)의 비율로 섞었다. 이때 소 혈청 알부민의 최종농도는 0.1 mg/ml이었다. 이를 실온에서 30분간 방치한 후 원심분리하여 상층액을 취하였다. 취한 상층액을 SEC로 정량하여 콘드로이틴 황산과 복합체를 이루지 않은 소 혈청 알부민의 양을 계산하여 그 결과를 도 4에 나타내었다.

<54> <시험예 5> 알파-락트 알부민과 텍스트란 황산의 복합체 시험

<55> 알파-락트 알부민과 텍스트란 황산(분자량: 4,000)을 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 4.0)에서 1:0.1, 1:0.5, 1:1, 1:2 (w/w)의 비율로 섞었다. 이때 알파-락트 알부민의 최종농도는 1.0 mg/ml이었다. 이를 실온에서 30분간 방치한 후 원심분리하여 상층액을 취하였다. 취한 상층액을 SEC로 정량하여 텍스트란 황산과 복합체를 이루지 않은 알파-락트 알부민의 양을 계산하여 그 결과를 도 5에 나타내었다.

<56> <시험예 6> 오브알부민과 텍스트란 황산의 복합체 시험

<57> 오브알부민과 텍스트란 황산(분자량: 4,000)을 10 mM 암모늄 아세테이트 완

충액(pH 4.0)에서 1:0.1, 1:0.5, 1:1, 1:2 (w/w)의 비율로 섞었다. 이때 오브알부민의 최종농도는 1.0 mg/ml이었다. 이를 실온에서 30분간 방치한 후 원심분리하여 상층액을 취하였다. 취한 상층액을 SEC로 정량하여 덱스트란 황산과 복합체를 이루지 않은 오브알부민의 양을 계산하여 그 결과를 도 6에 나타내었다.

<58> <시험예 7> 인간 성장 호르몬과 덱스트란 황산의 복합체 시험

<59> 인간 성장 호르몬과 덱스트란 황산(분자량: 2,500)을 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 4.0)에서 1:0.01, 1:0.02, 1:0.05, 1:0.1, 1:0.2, 1:0.5, 1:1 (w/w)의 비율로 섞었다. 이때 인간 성장 호르몬의 최종농도는 0.1 mg/ml이었다. 이를 실온에서 30분간 방치한 후 원심분리하여 상층액을 취하였다. 취한 상층액을 SEC로 정량하여 덱스트란 황산과 복합체를 이루지 않은 인간 성장 호르몬의 양을 계산하여 그 결과를 도 7에 나타내었다.

<60> <시험예 8> 인간 성장 호르몬과 덱스트란 황산의 복합체 시험

<61> 인간 성장 호르몬과 덱스트란 황산(분자량: 4,000)을 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 4.0)에서 1:0.1, 1:0.2, 1:0.5, 1:1 (w/w)의 비율로 섞었다. 이때 인간 성장 호르몬의 최종농도는 0.1 mg/ml 이었다. 이를 실온에서 30분간 방치한 후 원심분리하여 상층액을 취하였다. 취한 상층액을 SEC로 정량하여 덱스트란 황산과 복합체를 이루지 않은 인간 성장 호르몬의 양을 계산하여 그 결과를 도 8에 나타내었다.

<62> <시험예 9> 인간 성장 호르몬과 콘드로이틴 황산의 복합체 시험

<63> 인간 성장 호르몬과 콘드로이틴 황산을 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 4.0)에서 1:0.01, 1:0.02, 1:0.05, 1:0.1, 1:0.2, 1:0.5, 1:1 (w/w)의 비율로 섞었다. 이때 인간 성장 호르몬의 최종농도는 0.1 mg/ml 이었다. 이를 실온에서 30분간 방치한 후 원심분리하여 상층액을 취하였다. 취한 상층액을 SEC로 정량하여 콘드로이틴 황산과 복합체를 이루지 않은 인간 성장 호르몬의 양을 계산하여 그 결과를 도 9에 나타내었다.

<64> 도 1 내지 도 9에서 알 수 있듯이, 단백질과 황산 다당류가 복합체를 이루면 침전이 형성되어 용액 중의 용해성 단백질 모노머를 정량하였을 때 모노머가 용액 중에 거의 없거나 낮은 정도로만 존재함을 알 수 있다. 복합체의 형성은 통상 황산 다당류에 대한 단백질의 비율이 일정 비율 이상인 경우에 가능하며, 때에 따라서는 특정 비율에서만 효율적으로 복합체가 형성되는 경우도 있다(도 9).

<65> <시험예 10> pH에 따른 인간 성장 호르몬과 텍스트란 황산의 복합체 시험

<66> 인간 성장 호르몬과 텍스트란 황산(분자량: 4,000)을 10 mM 인산염·구연산 완충액 pH 2.5에서 pH 8.0까지 1:0.5 (w/w)의 비율로 섞었다. 이때 인간 성장 호르몬의 최종농도는 0.1 mg/ml 이었다. 이를 실온에서 30분간 방치한 후 원심분리하여 상층액을 취하였다. 취한 상층액을 SEC로 정량하여 텍스트란 황산과 복합체를 이루지 않은 인간 성장 호르몬의 양을 계산하여 그 결과를 도 10에 나타내었다.

- <67> <시험예 11> pH에 따른 인간 성장 호르몬과 콘드로이틴 황산의 복합체 시험
- <68> 인간 성장 호르몬과 콘드로이틴 황산을 10 mM 인산염·구연산 완충액 pH 2.5에서 pH 8.0까지 1:0.1(w/w)의 비율로 섞었다. 이때 인간 성장 호르몬의 최종농도는 0.1 mg/ml이었다. 이를 실온에서 30분간 방치한 후 원심분리하여 상층액을 취하였다. 취한 상층액을 SEC로 정량하여 콘드로이틴 황산과 복합체를 이루지 않은 인간 성장 호르몬의 양을 계산하여 그 결과를 도 11에 나타내었다.
- <69> 시험예 1에서 시험예 11까지의 결과를 볼 때 황산 다당류와 단백질은 단백질의 등전점(pI) 이하의 pH에서 불용성 복합체를 형성함을 알 수 있었다.
- <70> 또한 다음의 시험예를 통하여 등전점 이하의 pH에서 형성된 단백질과 황산 다당류의 복합체가 pH 변화에 의해 가역적으로 분리됨을 확인하였다. 아울러 등전점 이하의 pH에서 형성된 단백질과 황산 다당류 복합체는 단백질의 변성을 유발하는 환경에서 안정함을 확인할 수 있었으며 이는 등전점 이하에서 결합한 황산 다당류가 단백질의 안정화제로 작용함을 보여주고 있다.
- <71> <시험예 12> 인간 성장 호르몬과 텍스트란 황산 복합체의 pH에 따른 가역성 시험
- <72> 인간 성장 호르몬과 텍스트란 황산(분자량: 4000)을 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 3.0)에서 1:0.5(w/w)의 비율로 섞었다. 이때 인간 성장 호르몬의 최종농도는 0.1 mg/ml 이었다. 이를 실온에서 30분간 방치한 후 원심분리하여 상층액과 침전물을 분리하

여 취하였다. 침전물에 10 mM 수산화 나트륨 용액을 가하여 pH를 7.0으로 조정 한 후 이를 시험액으로 하였다. 0.1 mg/ml 농도의 인간 성장 호르몬 용액을 비교액으로 하여 시험액과 비교액의 인간 성장 호르몬의 양을 SEC를 이용하여 비교하였다.

<73> 도 12a는 인간 성장 호르몬의 비교액 크로마토그램, 도 12b는 인간 성장 호르몬과 텍스트란 황산(분자량: 4,000)을 10 mM 암모늄 아세테이트 pH 3.0 완충액에서 30분간 반응 후 원심분리하여 얻은 상층액의 크로마토그램, 도 12c는 침전된 복합체를 pH 7.0으로 다시 조정하여 얻은 크로마토그램이다. 도 12a와 도 12c에서의 인간 성장호르몬의 양은 동일하였으며 변성 단백질은 검출되지 않았다. 또한 도 12b에서는 인간 성장 호르몬이 거의 검출되지 않았다. 이를 통하여 인간 성장 호르몬과 텍스트란 황산의 복합체 형성은 등전점 이하의 pH에서 일어나며 이는 가역적인 것으로 단백질을 변성시키지 않음을 알 수 있다.

<74> <시험예 13> 복합체 형성에 의한 단백질 안정화 시험

<75> 인간 성장 호르몬-텍스트란 황산의 pH 3에서의 복합체, 인간 성장 호르몬-텍스트란 황산의 pH 7에서의 혼합액, 인간 성장 호르몬의 pH 7, pH 3 용액의 4가지 시험액을 인간 성장 호르몬의 농도가 0.1 mg/ml이 되도록 준비 하였다. 이 용액들을 수욕형 초음파 분쇄기(water bath type sonicator)에서 30초간 4℃에서 초음파분쇄(sonication)한 후 각 용액의 pH를 7.0으로 조정하여 원심분리하고 상층액을 취하였다. 각각의 상층액에 남아 있는 인간 성장 호르몬의 양을 SEC를 이용하여 정량하여 그 결과를 도 13에 나타내었다.

<76> 이 시험에서 pH 3에서의 복합체는 인간 성장 호르몬 표준액과 동일한 크로마토그램을 보였다. 반면, pH 7에서의 인간 성장 호르몬-덱스트란 황산의 혼합액, pH 3, pH 7의 인간 성장 호르몬 용액은 변성이 일어났음을 알 수 있었다. 이를 통하여 황산 다당류는 등전점 이하의 pH에서 단백질과 복합체를 형성하였을 때 단백질을 안정화시킴을 알 수 있었다.

<77> 이하 실시예, 비교예, 시험예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

<78> <실시예 1> 소 혈청 알부민과 덱스트란 황산(분자량: 500,000)의 복합 미세 입자 제조

<79> 0.1% 초산 용액에 소 혈청 알부민의 최종 농도가 3 mg/ml, 덱스트란 황산의 최종 농도가 15 mg/ml이 되도록 혼합 용해 시켜 소 혈청 알부민과 덱스트란 황산의 복합체를 만든 후 이 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기(Buchi-191)에 공급하여 소 혈청 알부민과 덱스트란 황산의 복합 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조 공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 3.5 μm 이었다.

<80> <실시예 2> 소 혈청 알부민 함유 미세 입자

<81> 실시예 1에서 제조된 소 혈청 알부민과 덱스트란 황산의 복합 미세 입자를 스테아르산이 5 mg/ml의 농도로 녹아있는 에탄올 용액에 소 혈청 알부민으로서 함량이 8.3%가

되도록 분산하여 얻어진 분산액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기 (Buchi-191)에 공급하여 소 혈청 알부민 함유 미세 입자를 제조하였다.

<82> <실시에 3> 소 혈청 알부민 함유 미세 입자

<83> 실시예 1에서 제조된 소 혈청 알부민과 덱스트란 황산의 복합 미세 입자를 팔미트산이 5 mg/ml의 농도로 녹아있는 에탄올 용액에 소 혈청 알부민으로서 함량이 8.3%가 되도록 분산하여 얻어진 분산액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기 (Buchi-191)에 공급하여 소 혈청 알부민 함유 미세 입자를 제조하였다.

<84> <실시에 4> 소 혈청 알부민 함유 미세 입자

<85> 실시예 1에서 제조된 소 혈청 알부민과 덱스트란 황산의 복합 미세 입자를 팔미트산이 5 mg/ml의 농도로 녹아있는 에탄올 용액에 소 혈청 알부민으로서 함량이 10%가 되도록 분산하여 얻어진 분산액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기 (Buchi-191)에 공급하여 소 혈청 알부민 함유 미세 입자를 제조하였다.

<86> <실시에 5> 인간 혈청 알부민 함유 미세 입자

<87> 10 mM 암모늄 바이카보네이트 완충액 (pH 7.0)에 인간 혈청 알부민의 최종 농도가 3 mg/ml, 덱스트란 황산의 최종 농도가 15 mg/ml이 되도록 혼합 용해 시켜 인간 혈청 알부민과 덱스트란 황산의 혼합액을 만든 후 이 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기 (Buchi-191)에 공급하여 인간 혈청 알부민과 덱스트란 황산의 혼합 미세 입자를 제조하

였다. 이 일차 미세 입자를 팔미트산이 5 mg/ml의 농도로 녹아있는 에탄올 용액에 인간 혈청 알부민으로서 함량이 8.3%가 되도록 분산하여 얻어진 분산액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기(Buchi-191)에 공급하여 인간 혈청 알부민 함유 미세 입자를 제조하였다.

<88> <비교예 1> 소 혈청 알부민의 일차 미세 입자의 제조

<89> 소 혈청 알부민의 농도가 5 mg/ml이 되도록 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 4.0)에 용해 시킨 후 이 용액을 2.5 ml/분의 유량으로 분무건조기 (Buchi-191)에 공급하여 소 혈청 알부민의 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 4 μ m이었다.

<90> <비교예 2> 소 혈청 알부민 함유 미세 입자

<91> 비교예 1에서 제조된 소 혈청 알부민의 일차 미세 입자를 폴리(락타이드-코-글라이콜라이드) (RG502H)가 5 mg/ml의 농도로 녹아있는 메칠렌클로라이드 용액에 소 혈청 알부민으로서 함량이 10%가 되도록 분산하여 얻어진 분산액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기(Buchi-191)에 공급하여 소 혈청 알부민 함유 미세 입자를 제조하였다.

<92> <비교예 3> 소 혈청 알부민 함유 미세 입자

<93> 비교예 1에서 제조된 소 혈청 알부민의 일차 미세 입자를 caprylate가 5 mg/ml의 농도로 녹아있는 에탄올 용액에 소 혈청 알부민으로서 함량이 50%가 되도록 분산하여 얻

어진 분산액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기(Buchi-191)에 공급하여 소 혈청 알부민 함유 미세 입자를 제조하였다.

<94> <비교예 4> 소 혈청 알부민 함유 미세 입자

<95> 비교예 1에서 제조된 소 혈청 알부민의 일차 미세 입자를 caprylate가 5 mg/ml의 농도로 녹아있는 에탄올 용액에 소 혈청 알부민으로서 함량이 10%가 되도록 분산하여 얻어진 분산액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기(Buchi-191)에 공급하여 소 혈청 알부민 함유 미세 입자를 제조하였다.

<96> <비교예 5> 소 혈청 알부민 함유 미세 입자

<97> 비교예 1에서 제조된 소 혈청 알부민의 일차 미세 입자를 팔미트산이 5 mg/ml의 농도로 녹아있는 에탄올 용액에 소 혈청 알부민으로서 함량이 3.3%가 되도록 분산하여 얻어진 분산액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기(Buchi-191)에 공급하여 소 혈청 알부민 함유 미세 입자를 제조하였다.

<98> <비교예 6> 소 혈청 알부민 함유 미세 입자

<99> 비교예 1에서 제조된 소 혈청 알부민의 일차 미세 입자를 팔미트산이 5 mg/ml의 농도로 녹아있는 에탄올 용액에 소 혈청 알부민으로서 함량이 8.3%가 되도록 분산하여 얻어진 분산액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기(Buchi-191)에 공급하여 소 혈청 알부민 함유 미세 입자를 제조하였다.

- <100> <시험예 14> 단백질 함유 미세 입자의 체외 방출 시험
- <101> 실시예 2~5, 비교예 2~6에서 제조된 단백질 함유 미세입자 2 mg을 10 mM 인산완충액(pH 7.4)에 현탁시킨 후 7일간 37℃에서 체외 방출 시험을 실시하였다. 일정 시간 후에 현탁액을 원심분리하여 상층액에 방출된 단백질을 SEC로 정량하여 그 결과를 도 14와 도 15에 나타내었다.
- <102> 도 14에서 보는 바와 같이 황산 다당류와 복합체를 형성한 단백질을 함유하는 미세 입자는 초기 방출양도 10% 이내였고 방출 속도도 비교적 일정하며 7일 동안 서방출성을 나타내고 있다. 반면, 도 15에서 보는 바와 같이 황산 다당류와 복합체를 형성하지 않은 단백질을 함유하는 미세 입자는 초기 방출이 높거나 초기 방출 후 전혀 방출이 되지 않는 등 서방출성을 가지지 못하였다.
- <103> <실시예 6> 인간 성장 호르몬과 텍스트란 황산(분자량: 500,000)의 복합 미세 입자의 제조
- <104> 1% 초산 용액에 인간 성장 호르몬의 최종 농도가 3 mg/ml, 텍스트란 황산의 최종 농도가 15 mg/ml이 되도록 혼합 용해 시켜 인간 성장 호르몬과 텍스트란 황산의 복합체를 만든 후 이 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기 (Buchi-191)에 공급하여 인간 성장 호르몬과 텍스트란 황산의 복합 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 3.2 μm 이었다.

- <105> <실시예 7> 인간 성장 호르몬 함유 미세 입자의 제조
- <106> 실시예 6에서 제조된 인간 성장 호르몬과 텍스트란 황산의 복합 미세 입자 0.5 g을 트리스테아린이 5 mg/ml의 농도로 녹아있는 메칠렌클로라이드 50 ml에 분산하여 얻어진 분산액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기 (Buchi-191)에 공급하여 트리스테아린이 피복된 평균 입자경 6.5 mm 크기의 미세 입자를 제조하였다.
- <107> <시험예 15> 서방성 미세 입자 제조 후, 방출 중 입자 내 단백질의 안정성 시험
- <108> 실시예 7에서 만들어진 인간 성장 호르몬 함유 미세 입자로부터 추출한 인간 성장 호르몬과 이 입자의 체외 방출 시험 5일 후의 제형에 남아있는 단백질을 추출하여 단백질의 SEC 크로마토그램을 도 16b와 도 16c에 나타내었다.
- <109> 도 16b와 도 16c에서 보는 바와 같이 인간 성장 호르몬 함유 입자의 제조 과정 중에 단백질이 변성되지 않았으며 체외 방출 실험 기간 중에도 변성되지 않았음을 알 수 있다.
- <110> 이하 다음의 실시예를 통하여 본 발명에 따른 단백질 함유 서방성 제형을 제조하는 방법에 관하여 더욱 상세히 설명한다. 다만, 본 발명의 범위가 상기 및 하기 실시예만으로 한정되는 것은 아니다.
- <111> <실시예 8> 소 혈청 알부민과 텍스트란 황산(분자량: 2,500)의 복합 미세 입자의 제조

- <112> 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 4.0)에 소 혈청 알부민의 최종 농도가 5 mg/ml, 텍스트란 황산의 최종 농도가 1 mg/ml이 되도록 혼합 용해 시켜 소 혈청 알부민과 텍스트란 황산의 복합체를 만든 후 이 용액을 5 ml/분의 유량으로 분무건조기 (Buchi-191)에 공급하여 소 혈청 알부민과 텍스트란 황산의 복합 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 4 μ m이었다.
- <113> <실시에 9> 소 혈청 알부민과 헤파란 황산의 복합 미세 입자의 제조
- <114> 50 mM 인산 완충액(pH 3.0)에 소 혈청 알부민의 최종 농도가 5 mg/ml, 헤파란 황산의 최종 농도가 1 mg/ml이 되도록 혼합 용해 시켜 소 혈청 알부민과 헤파란 황산의 복합체를 만든 후 이 용액을 5 ml/분의 유량으로 분무건조기 (Buchi-191)에 공급하여 소 혈청 알부민과 헤파란 황산의 복합 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 4 μ m이었다.
- <115> <실시에 10> 소 혈청 알부민과 텍스트란 황산(분자량: 500,000)의 복합 미세 입자의 제조
- <116> 50% 초산 용액에 소 혈청 알부민의 최종 농도가 5 mg/ml, 텍스트란 황산의 최종 농도가 1 mg/ml이 되도록 혼합 용해 시켜 소 혈청 알부민과 텍스트란 황산의 복합체를 만든 후 이 용액을 5 ml/분의 유량으로 분무건조기(Buchi-191)에 공급하여 소 혈청 알부민

과 텍스트란 황산의 복합 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 60℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 4.5 μm 이었다.

<117> <실시에 11> 소 혈청 알부민과 헤파린의 복합 미세 입자의 제조

<118> 5 mM 인산 완충액(pH 4.0)에 소 혈청 알부민의 최종 농도가 3 mg/ml, 헤파린의 최종 농도가 15 mg/ml이 되도록 혼합 용해 시켜 소 혈청 알부민과 헤파린의 복합체를 만든 후 이 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기 (Buchi-191)에 공급하여 소 혈청 알부민과 헤파린의 복합 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 3.5 μm 이었다.

<119> <실시에 12> 인간 혈청 알부민과 텍스트란 황산(분자량: 500,000)의 복합 미세 입자의 제조

<120> 0.1% 초산 용액에 인간 혈청 알부민의 최종 농도가 3 mg/ml, 텍스트란 황산의 최종 농도가 15 mg/ml이 되도록 혼합 용해 시켜 인간 혈청 알부민과 텍스트란 황산의 복합체를 만든 후 이 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무 건조기(Buchi-191)에 공급하여 인간 혈청 알부민과 텍스트란 황산의 복합 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세 입자의 평균 직경은 3.8 μm 이었다.

<121> <실시에 13> 안정화제를 포함하는 인간 혈청 알부민과 텍스트란 황산(분자량: 500,000)의 복합 미세 입자의 제조

<122> 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 5.0)에 인간 혈청 알부민의 최종 농도가 5 mg/ml이 되도록 하면서 인간 혈청 알부민:텍스트란 황산:글라이신의 비율이 1:5:4 (w/w/w)인 용액을 만들었다. 이 용액을 3ml/분의 유량으로 분무건조기 (Buchi-191)에 공급하여 안정화제를 포함하는 인간 혈청 알부민과 텍스트란 황산의 복합 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 105℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 3 μ m이었다.

<123> <실시에 14> 안정화제를 포함하는 인간 혈청 알부민과 헤파린의 복합 미세 입자의 제조

<124> Tween 80을 0.05 중량% 함유하는 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 5.0)에 인간 혈청 알부민의 최종 농도가 5 mg/ml이 되도록 하면서 인간 혈청 알부민:헤파린:트리할로오스의 비율이 1:5:4 (w/w/w)인 용액을 만들었다. 이 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기(Buchi-191)에 공급하여 안정화제를 포함하는 인간 혈청 알부민과 헤파린의 복합 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 105℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 3 μ m이었다.

<125> <실시에 15> 인간 성장 호르몬과 헤파란 황산의 복합 미세 입자의 제조

<126> 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 4.0)에 인간 성장 호르몬의 최종 농도가 5 mg/ml, 헤파란 황산의 최종 농도가 1 mg/ml이 되도록 혼합 용해 시켜 인간 성장 호르몬과 헤파란 황산의 복합체를 만든 후 이 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기

(Buchi-191)에 공급하여 인간 성장 호르몬과 헤파란 황산의 복합 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 4 μm 이었다.

<127> <실시에 16> 인간 성장 호르몬과 텍스트란 황산(분자량: 2,500)의 복합 미세 입자의 제조

<128> 50 mM 인산 완충액(pH 4.0)에 인간 성장 호르몬의 최종 농도가 5 mg/ml, 텍스트란 황산의 최종 농도가 1 mg/ml이 되도록 혼합 용해 시켜 인간 성장 호르몬과 텍스트란 황산의 복합체를 만든 후 이 용액을 5 ml/분의 유량으로 분무건조기 (Buchi-191)에 공급하여 인간 성장 호르몬과 텍스트란 황산의 복합 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 3.8 μm 이었다.

<129> <실시에 17> 안정화제를 포함하는 인간 성장 호르몬과 텍스트란 황산(분자량: 500,000)의 복합 미세 입자의 제조

<130> 50% 초산 용액에 염화 아연이 0.02 mg/ml, 인간 성장 호르몬의 최종 농도가 3 mg/ml, 텍스트란 황산의 최종 농도가 15 mg/ml이 되도록 혼합 용해 시켜 인간 성장 호르몬과 텍스트란 황산의 복합체를 만든 후 이 용액을 4 ml/분의 유량으로 분무건조기 (Buchi-191)에 공급하여 안정화제를 포함하는 인간 성장 호르몬과 텍스트란 황산의 복합

미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 90℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 4 μm 이었다.

<131> <실시예 18> 인간 성장 호르몬과 콘드로이틴 황산의 복합 미세 입자의 제조

<132> 0.1% 초산 용액에 인간 성장 호르몬의 최종 농도가 3 mg/ml, 콘드로이틴 황산의 최종 농도가 15 mg/ml이 되도록 혼합 용해 시켜 인간 성장 호르몬과 콘드로이틴 황산의 복합체를 만든 후 이 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기 (Buchi-191)에 공급하여 인간 성장 호르몬과 콘드로이틴 황산의 복합 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 3 μm 이었다.

<133> <실시예 19> 인간 성장 호르몬과 더마탄 황산의 복합 미세 입자의 제조

<134> 0.1% 초산 용액에 인간 성장 호르몬의 최종 농도가 3 mg/ml, 더마탄 황산의 최종 농도가 20 mg/ml이 되도록 혼합 용해 시켜 인간 성장 호르몬과 더마탄 황산의 복합체를 만든 후 이 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기 (Buchi-191)에 공급하여 인간 성장 호르몬과 더마탄 황산의 복합 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 4 μm 이었다.

<135> <실시예 20> 인간 성장 호르몬과 케라탄 황산의 복합 미세 입자의 제조

<136> 0.1% 초산 용액에 인간 성장 호르몬의 최종 농도가 3 mg/ml, 케라탄 황산의 최종 농도가 15 mg/ml이 되도록 혼합 용해 시켜 인간 성장 호르몬과 케라탄 황산의 복합체를

만든 후 이 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기 (Buchi-191)에 공급하여 인간 성장 호르몬과 케라탄 황산의 복합 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 3.8 μm 이었다.

<137> <실시예 21> 인터페론-알파와 덱스트란 황산(분자량: 500,000)의 복합 미세 입자의 제조

<138> 덱스트란 황산:인터페론-알파의 비율이 59:1 (w/w)이 되도록 혼합한 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기 (Buchi-191)에 공급하여 인터페론-알파와 덱스트란 황산의 복합 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 3 μm 이었다.

<139> <실시예 22> 안정화제를 함유하는 인터페론-알파와 덱스트란 황산(분자량: 500,000)의 복합미세 입자의 제조

<140> 덱스트란 황산:인간 혈청 알부민:인터페론-알파의 비율이 50:9:1 (w/w/w)이 되도록 혼합한 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기 (Buchi-191)에 공급하여 안정화제를 함유하는 인터페론-알파와 덱스트란 황산의 복합 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 95℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 3.5 μm 이었다.

- <141> <실시에 23> 안정화제를 포함하는 인터페론-알파와 텍스트란 황산(분자량: 500,000)의 복합 미세 입자의 제조
- <142> 텍스트란 황산:만니톨:인터페론-알파의 비율이 50:9:1 (w/w/w)이 되도록 혼합한 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기 (Buchi-191)에 공급하여 인터페론-알파를 함유하는 일차 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 105℃ 이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 4.5 μm 이었다.
- <143> <실시에 24> 안정화제를 함유하는 인터페론-알파와 케라탄 황산의 복합 미세 입자의 제조
- <144> 글라이신:케타란 황산:인터페론-알파의 비율이 4:5:1 (w/w/w)이 되도록 혼합한 용액을 2.5 ml/분의 유량으로 분무건조기 (Buchi-191)에 공급하여 인터페론-알파를 함유하는 일차 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 105℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 3 μm 이었다.
- <145> <실시에 25> 에리트로포이에틴(EPO)과 텍스트란 황산(분자량: 500,000)의 복합 미세 입자의 제조
- <146> 0.1% 초산 용액에 에리트로포이에틴과 텍스트란 황산의 비율이 1:5 (w/w)가 되도록 혼합 용해시켜 에리트로포이에틴과 텍스트란 황산의 복합체를 만든 후 이 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기 (Buchi-191)에 공급하여 에리트로포이에틴과 텍스트란 황산의

복합 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 3 μm 이었다.

<147> <실시예 26> 콜로니자극인자(G-CSF)와 텍스트란 황산(분자량: 500,000)의 복합 미세 입자의 제조

<148> 0.1% 초산 용액에 콜로니자극인자와 텍스트란 황산의 비율이 1:5 (w/w)가 되도록 혼합 용해 시켜 콜로니자극인자와 텍스트란 황산의 복합체를 만든 후 이 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기 (Buchi-191)에 공급하여 콜로니자극인자와 텍스트란 황산의 복합 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 3 μm 이었다.

<149> <실시예 27> 소 혈청 알부민 함유 미세 입자의 제조

<150> 실시예 1에서 제조된 소 혈청 알부민과 텍스트란 황산의 복합 미세 입자 0.5 g을 미리스트산이 10 mg/ml의 농도로 녹아있는 에탄올 50 ml에 분산하여 얻어진 분산액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 미리스트산이 피복된 평균 입자경 7 mm 크기의 미세 입자를 제조하였다.

<151> <실시예 28> 소 혈청 알부민 함유 미세 입자의 제조

<152> 실시예 1에서 제조된 소 혈청 알부민과 텍스트란 황산의 복합 미세 입자 0.5 g을 스테아릴산이 10 mg/ml의 농도로 녹아있는 에탄올 50 ml에 분산하여 얻어진 분산액을 3

ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 올레인산이 피복된 평균 입자경 6.3 mm 크기의 미세 입자를 제조하였다.

<153> <실시예 29> 소 혈청 알부민 함유 미세 입자의 제조

<154> 실시예 1에서 제조된 소 혈청 알부민과 텍스트란 황산의 복합 미세 입자 0.5 g을 스파60이 10 mg/ml의 농도로 녹아있는 에탄올 50 ml에 분산하여 얻어진 분산액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 스파60이 피복된 평균 입자경 5 mm 크기의 미세 입자를 제조하였다.

<155> <실시예 30> 인간 성장 호르몬 함유 미세 입자의 제조

<156> 실시예 18에서 제조된 인간 성장 호르몬과 콘드로이틴 황산의 복합 미세 입자 0.5 g을 팔미트산이 5 mg/ml의 농도로 녹아있는 에탄올 50 ml에 분산하여 얻어진 분산액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 팔미트산이 피복된 평균 입자경 6.3 mm 크기의 미세 입자를 제조하였다.

<157> <실시예 31> 인간 성장 호르몬 함유 미세 입자의 제조

<158> 실시예 6에서 제조된 인간 성장 호르몬과 텍스트란 황산의 복합 미세 입자 0.5 g을 스테아르산이 5 mg/ml의 농도로 녹아있는 에탄올 50 ml에 분산하여 얻어진 분산액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 스테아르산이 피복된 평균 입자경 6 mm 크기의 미세 입자를 제조하였다.

<159> <실시예 32> 인간 성장 호르몬 함유 미세 입자의 제조

<160> 실시예 6에서 제조된 인간 성장 호르몬과 텍스트란 황산의 복합 미세 입자 0.5 g을 글라이세릴 모노스테아레이트가 5 mg/ml의 농도로 녹아있는 에탄올 50 ml에 분산하여 얻어진 분산액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 글라이세릴 모노스테아레이트가 피복된 평균 입자경 5.5 mm 크기의 미세 입자를 제조하였다.

<161> <실시예 33> 인간 성장 호르몬 함유 미세 입자의 제조

<162> 실시예 19에서 제조된 인간 성장 호르몬과 더마탄 황산의 복합 미세 입자 0.5 g을 다이팔미토일 포스파티딜산이 5 mg/ml의 농도로 녹아있는 클로로포름 50 ml에 분산하여 얻어진 분산액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 다이팔미토일 포스파티딜산이 피복된 평균 입자경 5.3 mm 크기의 미세 입자를 제조하였다.

<163> <실시예 34> 인간 성장 호르몬 함유 미세 입자의 제조

<164> 실시예 20에서 제조된 인간 성장 호르몬과 케라탄 황산의 복합 미세 입자 0.5 g을 다이스테아릴 포스파티딜콜린이 10 mg/ml의 농도로 녹아있는 에탄올 50 ml에 분산하여 얻어진 분산액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 다이스테아릴 포스파티딜콜린이 피복된 평균 입자경 6.2 mm 크기의 미세 입자를 제조하였다.

<165> <실시예 35> 인터페론-알파 함유 미세 입자의 제조

<166> 실시예 21에서 제조된 인터페론-알파와 텍스트란 황산의 복합 미세 입자 0.25 g을 팔미트산이 10 mg/ml의 농도로 녹아있는 에탄올 25 ml에 분산하여 얻어진 분산액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 팔미트산이 피복된 평균 입자경 5 mm 크기의 미세 입자를 제조하였다.

<167> <실시예 36> 인터페론-알파 함유 미세 입자의 제조

<168> 실시예 23에서 제조된 인터페론-알파의 일차 복합 미세 입자 0.25 g을 글라이세릴 모노스테아레이트가 10 mg/ml의 농도로 녹아있는 에탄올 250 ml에 분산하여 얻어진 분산액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 글라이세릴 모노스테아레이트가 피복된 평균 입자경 6.4 mm 크기의 미세 입자를 제조하였다.

<169> <실시예 37> 에리트로포이에틴(EPO) 함유 미세 입자의 제조

<170> 실시예 25에서 제조된 에리트로포이에틴과 텍스트란 황산의 복합 미세 입자 0.25 g을 스테아르산이 10 mg/ml의 농도로 녹아있는 에탄올 25 ml에 분산하여 얻어진 분산액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 스테아르산이 피복된 평균 입자경 5 mm 크기의 미세 입자를 제조하였다.

<171> <실시예 38> 콜로니자극인자(G-CSF) 함유 미세 입자의 제조

<172> 실시예 26에서 제조된 콜로니자극인자(G-CSF)와 텍스트란 황산의 복합 미세 입자 0.25 g을 팔미트산이 10 mg/ml의 농도로 녹아있는 에탄올 25 ml에 분산하여 얻어진 분산

액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 팔미트산이 피복된 평균 입자경 5 mm 크기의 미세 입자를 제조하였다.

<173> <실시예 39> 인간 성장 호르몬 함유 미세 입자의 제조

<174> 인간 성장 호르몬과 덱스트란 황산(분자량: 500,000)이 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 4.0)에 1:2 (w/w)의 비율로 용해되어 있는 용액과 글라이세릴 모노스테아레이트가 5 mg/ml의 농도로 에탄올에 녹아있는 용액을 혼합하여 얻어진 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 글라이세릴 모노스테아레이트가 피복된 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 5.2 μm 이었다.

<175> <실시예 40> 인간 성장 호르몬 함유 미세 입자의 제조

<176> 인간 성장 호르몬과 덱스트란 황산(분자량: 500,000)이 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 4.0)에 1:5 (w/w)의 비율로 용해되어있는 용액과 글라이세릴 모노스테아레이트가 5 mg/ml의 농도로 에탄올에 녹아있는 용액을 혼합하여 얻어진 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 글라이세릴 모노스테아레이트가 피복된 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 4.8 μm 이었다.

<177> <실시예 41> 인간 성장 호르몬 함유 미세 입자의 제조

<178> 인간 성장 호르몬과 콘드로이틴 황산이 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 4.0)에 1:2의 비율로 용해되어있는 용액과 스테아르산이 5 mg/ml의 농도로 에탄올에 녹아있는 용액을 혼합하여 얻어진 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 스테아르산이 피복된 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 4.8 μm 이었다.

<179> <실시예 42> 인간 성장 호르몬 함유 미세 입자의 제조

<180> 인간 성장 호르몬과 케라탄 황산이 1% 초산 용액에 1:2의 비율로 용해되어있는 용액과 팔미트산이 5 mg/ml의 농도로 에탄올에 녹아있는 용액을 혼합하여 얻어진 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 팔미트산이 피복된 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 80℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 5.1 μm 이었다.

<181> <실시예 43> 인간 성장 호르몬 함유 미세 입자의 제조

<182> 인간 성장 호르몬과 헤파란 황산이 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 4.0)에 1:1의 비율로 용해되어있는 용액과 스테아르산이 5 mg/ml의 농도로 에탄올에 녹아있는 용액을 혼합하여 얻어진 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 스테아르산이 피복된 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 75℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 5.2 μm 이었다.

<183> <실시예 44> 인터페론-알파 함유 미세 입자의 제조

<184> 인터페론-알파가 덱스트란 황산과 1:1 (w/w)의 비율로 용해되어있는 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 5.0)과 글라이세릴 모노스테아레이트가 5 mg/ml의 농도로 에탄올에 녹아있는 용액을 혼합하여 얻어진 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 글라이세릴 모노스테아레이트가 피복된 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 4.7 μ m이었다.

<185> <실시예 45> 인터페론-알파 함유 미세 입자의 제조

<186> 인터페론-알파, 콘드로이틴 황산, 알라닌이 1:1:5 (w/w)의 비율로 용해되어있는 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 4.0)과 글라이세릴 모노스테아레이트가 5 mg/ml의 농도로 에탄올에 녹아있는 용액을 혼합하여 얻어진 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 글라이세릴 모노스테아레이트가 피복된 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 5 μ m이었다.

<187> <실시예 46> 인터페론-알파 함유 미세 입자의 제조

<188> 인터페론-알파, 더마탄 황산, 하이드록시 베타사이클로덱스트린이 1:1:2 (w/w/w)의 비율로 용해되어있는 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 5.0)과 스테아르산이 5 mg/ml의 농도로 에탄올에 녹아있는 용액을 혼합하여 얻어진 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무

건조기에 공급하여 스테아르산이 피복된 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 4.5 μm 이었다.

<189> <실시에 47> 인터페론-알파 함유 미세 입자의 제조

<190> 인터페론-알파, 케라탄 황산, 트리할로오스가 1:2:5 (w/w/w)의 비율로 용해되어있는 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 5.0)과 팔미트산이 5 mg/ml의 농도로 에탄올에 녹아있는 용액을 혼합하여 얻어진 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 팔미트산이 피복된 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 5.8 μm 이었다.

<191> <실시에 48> 소 혈청 알부민을 함유하는 미세 입자의 제조

<192> 소 혈청 알부민과 텍스트란 황산이 1:1 (w/w)의 비율로 용해되어있는 1% 초산 용액을 액체 질소 상에 분무하여 얻어진 입자를 동결건조하여 일차 입자를 제조하였다. 이 입자 0.5 g을 팔미트산이 5 mg/ml의 농도로 용해되어 있는 에탄올 용액에 분산하여 얻어진 용액을 2.5 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 팔미트산이 피복된 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세 입자의 평균 직경은 4 μm 이었다.

<193> <실시에 49> 소 혈청 알부민을 함유하는 미세 입자의 제조

<194> 소 혈청 알부민과 콘드로이틴 황산이 1:1 (w/w)의 비율로 용해되어있는 1% 초산 용액을 액체 질소 상에 분무하여 얻어진 입자를 동결건조하여 일차 입자를 제조하였다. 이 입자 0.5 g을 팔미트산이 5 mg/ml의 농도로 용해되어 있는 에탄올 용액에 분산하여 얻어진 용액을 2.5 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 팔미트산이 피복된 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세 입자의 평균 직경은 4.8 μm 이었다.

<195> <실시에 50> 소 혈청 알부민을 함유하는 미세 입자의 제조

<196> 소 혈청 알부민과 더마탄 황산이 1:1 (w/w)의 비율로 용해되어있는 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 5.0)을 액체 질소 상에 분무하여 얻어진 입자를 동결건조하여 일차 입자를 제조하였다. 이 입자 0.5 g을 팔미트산이 5 mg/ml의 농도로 용해되어 있는 에탄올 용액에 분산하여 얻어진 용액을 2.5 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 팔미트산이 피복된 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 5.8 μm 이었다.

<197> <실시에 51> 인간 성장 호르몬을 함유하는 미세 입자의 제조

<198> 인간 성장 호르몬과 덱스트란 황산이 1:1 (w/w)의 비율로 용해되어있는 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 4.0)을 액체 질소 상에 분무하여 얻어진 입자를 동결건조하여 일차 입자를 제조하였다. 이 입자 0.5 g을 팔미트산이 10 mg/ml의 농도로 용해되어 있는 에탄올 용액에 분산하여 얻어진 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 팔

미트산이 피복된 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 6.2 μm 이었다.

<199> <실시예 52> 인터페론-알파를 함유하는 미세 입자의 제조

<200> 인터페론-알파와 덱스트란 황산, 폴리에틸렌글리콜이 1:1:2 (w/w/w)의 비율로 용해되어있는 10 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 4.0)을 액체 질소 상에 분무하여 얻어진 입자를 동결건조하여 일차 입자를 제조하였다. 이 입자 0.05 g을 팔미트산이 10 mg/ml의 농도로 용해되어 있는 에탄올 용액에 분산하여 얻어진 용액을 2.5 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 팔미트산이 피복된 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 5.8 μm 이었다.

<201> <실시예 53> 에리트로포이에틴을 함유하는 미세 입자의 제조

<202> 에리트로포이에틴과 덱스트란 황산, 슈크로오즈가 1:1:5 (w/w/w)의 비율로 용해되어있는 1% 초산 용액을 액체 질소 상에 분무하여 얻어진 입자를 동결건조하여 일차 입자를 제조하였다. 이 입자 0.05 g을 스테아르산이 5 mg/ml의 농도로 용해되어 있는 에탄올 용액에 분산하여 얻어진 용액을 3 ml/분의 유량으로 분무건조기에 공급하여 스테아르산이 피복된 미세 입자를 제조하였다. 이 때 분무건조기로 유입되는 건조공기의 온도는 85℃이고 얻어진 미세입자의 평균 직경은 4.9 μm 이었다.

【발명의 효과】

<203> 상기한 바와 같이, 본 발명에 의하여 활성 성분인 단백질 약물이 황산 다당류와 복합체를 이루어 안정화된 상태에서 소수성 물질이 감싸고 있는 형태의 서방성 제형을 제조할 수가 있다. 뿐만 아니라, 본 발명에 의하면, 복합체를 형성하지 않은 경우에도 단백질과 황산 다당류의 혼합물이 리피드 등의 소수성 매트릭스 물질에 둘러싸인 경우에도 서방출성을 지닌 약제형을 제공할 수 있다.

<204> 또한, 본 발명에 의하여 제조된 단백질 서방성 제형은 체내에 투여 되었을 때 단백질 약물을 활성형태로 일정기간동안 유효농도로 지속적으로 방출함으로써, 효과적으로 질병을 치료하는데 사용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

서방성 단백질 약물의 제조방법에 있어서,
단백질 약물과 황산 다당류의 혼합물을 제조하는 공정;
상기 공정으로부터 얻은 단백질 약물과 황산 다당류의 혼합물을 소수성 물질이 균일하게 용해되어 있는 용액에 고루 분산시키는 공정;
상기 용액으로부터 용매를 제거하여 고체상의 단백질 함유 서방성 제형을 얻는 공정;이 순차적으로 구성된 것을 특징으로 하는 서방성 단백질 약물 제조방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 황산 다당류는 덱스트란황산, 콘드로이틴황산, 더마탄황산, 헤파린, 헤파란황산 및 케라탄황산으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 서방성 단백질 약물 제조방법.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 소수성 물질은 지방산, 파모익산, 모노아실 글리세롤, 소비탄 지방산 에스테르, 다이아실 글리세롤, 트리글리세라이드, 포스포리피드, 스펅고리피드, 왁스와 이들의 염 및 유도체 중에서 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 서방성 단백질 약물 제조방법.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 서방성 단백질 약물 중 황산 다당류 함량이 0.01-95% (w/w)인 것을 특징으로 하는 서방성 단백질 약물 제조방법.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 단백질과 황산 다당류의 혼합물이 고체상의 미세입자 상태인 것을 특징으로 하는 서방성 단백질 약물 제조방법.

【청구항 6】

제5항에 있어서, 고체상의 단백질과 황산 다당류의 혼합물은 수용액 내에 분산 또는 용해되어 있는 단백질 및 황산 다당류의 혼합액을 건조 과정을 거쳐 제조되는 것임을 특징으로 하는 서방성 단백질 약물 제조방법.

【청구항 7】

제6항에 있어서, 건조 과정은 분무건조, 동결건조, 분무동결건조 또는 초임계 유체를 이용한 건조과정인 것을 특징으로 하는 서방성 단백질 약물 제조방법.

【청구항 8】

제1항에 있어서, 단백질과 황산 다당류의 혼합물이 수용액에 분산 또는 용해되어 있는 액체 상태인 것을 특징으로 하는 서방성 단백질 약물 제조방법.

【청구항 9】

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질과 황산 다당류 혼합물의 수용액의 pH가 단백질의 등전점 이하인 것을 특징으로 하는 서방성 단백질 약물 제조방법.

【청구항 10】

제1항에 있어서, 단백질 약물과 황산 다당류의 혼합물을 제조하는 공정 및/또는 상기 공정으로부터 얻은 단백질 약물과 황산 다당류의 혼합물을 소수성 물질이 균일하게

용해되어 있는 용액에 고루 분산시키는 공정 중에 단백질 안정화제를 추가하는 것을 특징으로 하는 서방성 단백질 약물 제조방법.

【청구항 11】

제10항에 있어서, 상기 단백질 안정화제가 슈크로오즈, 트리할로오스, 말토오즈, 만니톨, 락토오즈, 만노오즈, 폴리올, 텍스트란, 폴리에틸렌글리콜, 사이클로덱스트린, 폴리비닐알코올, 하이드록시프로필 메칠셀룰로오즈, 하이드록시에틸 셀룰로오즈, 폴리에틸렌이민, 폴리비닐피롤리돈, 젤라틴, 콜라젠, 알부민, 계면활성제, 아미노산, 무기염 및 이들의 혼합물 중에서 선택된 것임을 특징으로 하는 서방성 단백질 약물 제조방법.

【청구항 12】

서방성 단백질 약물에 있어서,
단백질과 황산 다당류의 혼합물이 소수성 물질에 둘러싸여 있는 서방성 단백질 약물.

【청구항 13】

제12항에 있어서, 황산 다당류는 텍스트란황산, 콘드로이틴황산, 더마탄황산, 헤파린, 헤파란황산 및 케라탄황산으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 서방성 단백질 약물.

【청구항 14】

제12항에 있어서, 소수성 물질은 지방산, 파모익산, 모노아실 글리세롤, 소비탄 지방산 에스테르, 다이아실 글리세롤, 트리글리세라이드, 포스포리피드, 스펅고리피드, 왁

스와 이들의 염 및 유도체 중에서 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 서방성 단백질 약물.

【청구항 15】

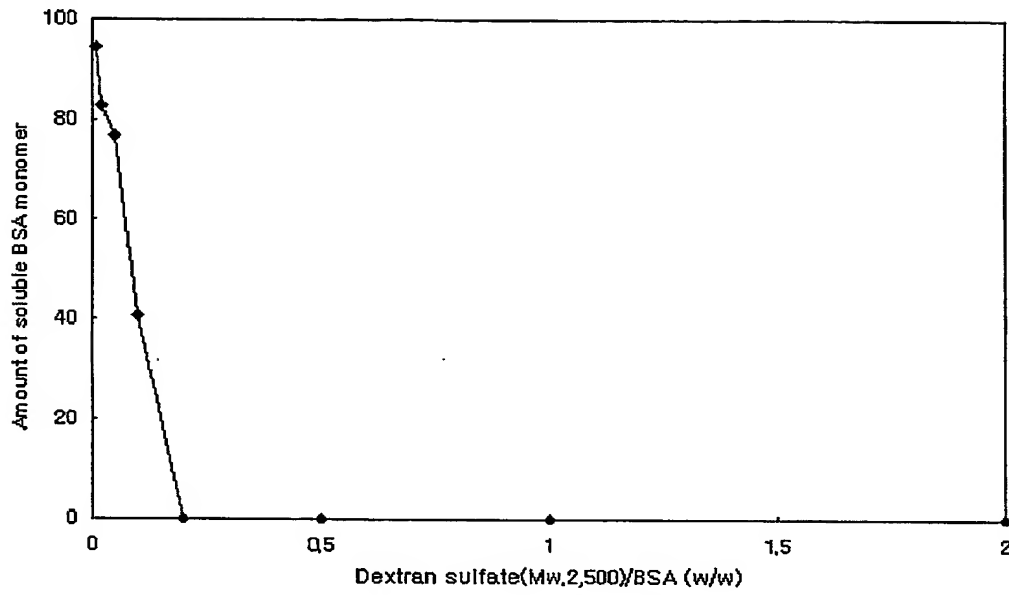
제12항에 있어서, 황산 다당류 함량이 0.01-95% (w/w)인 것을 특징으로 하는 서방성 단백질 약물.

【청구항 16】

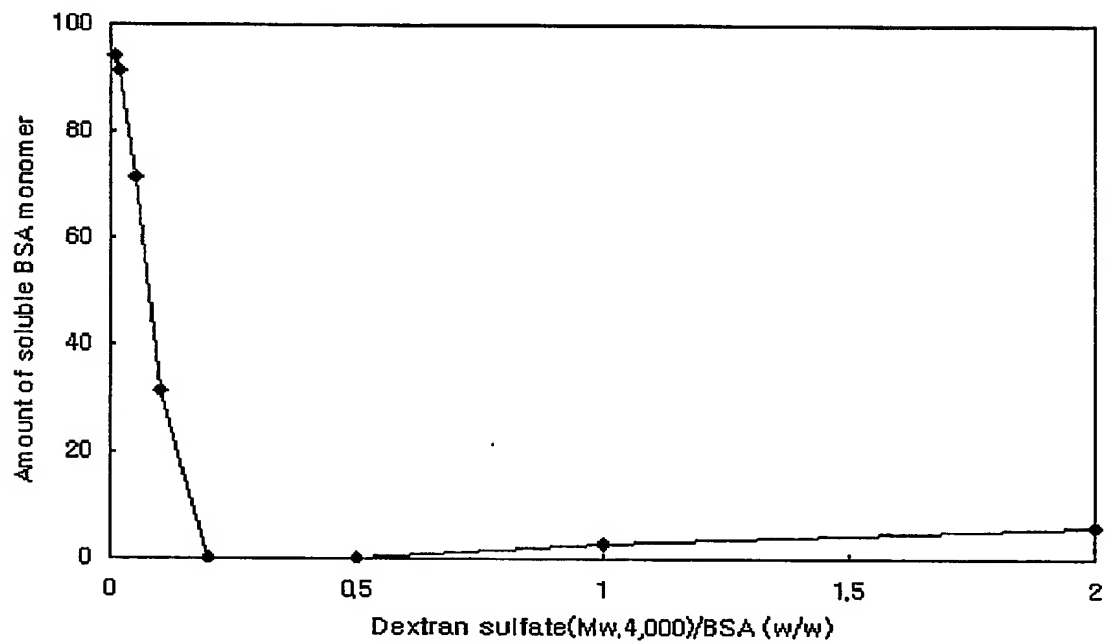
제12항에 있어서, 단백질 안정화제로서 슈크로오즈, 트리할로오스, 말토오즈, 만니톨, 락토오즈, 만노오즈, 폴리올, 덱스트란, 폴리에틸렌글리콜, 사이클로덱스트린, 폴리비닐알코올, 하이드록시프로필 메칠셀룰로오즈, 하이드록시에틸 셀룰로오즈, 폴리에틸렌이민, 폴리비닐피롤리돈, 젤라틴, 콜라젠, 알부민, 계면활성제, 아미노산, 무기염 및 이들의 혼합물 중에서 선택된 1종 이상이 부가되어 있는 것을 특징으로 하는 서방성 단백질 약물.

【도면】

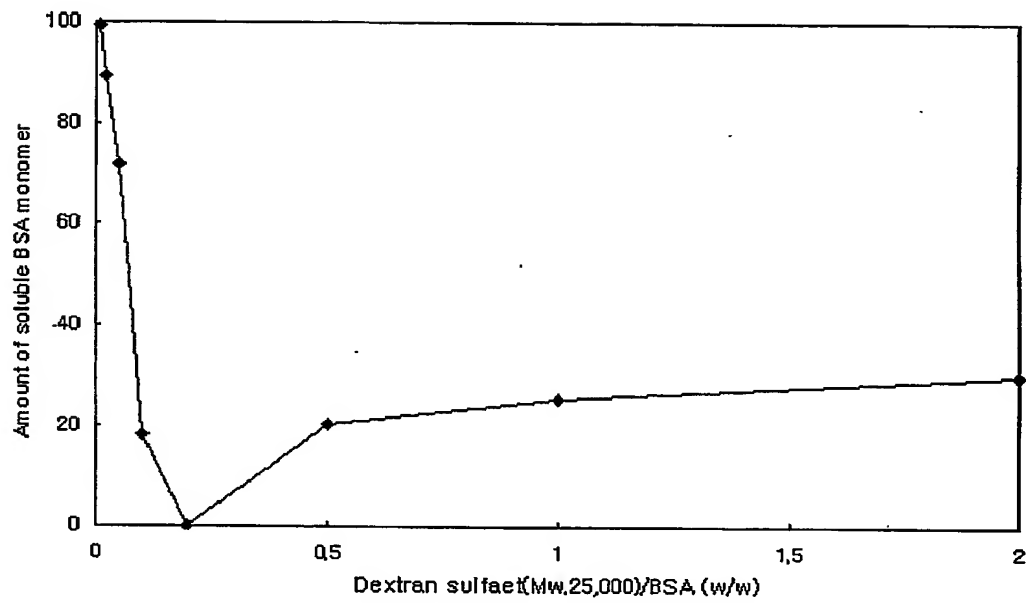
【도 1】



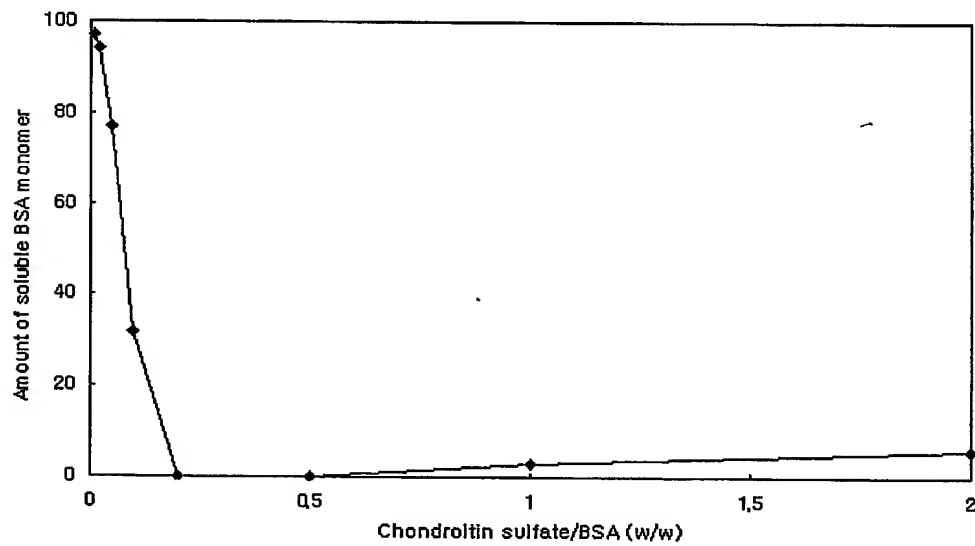
【도 2】



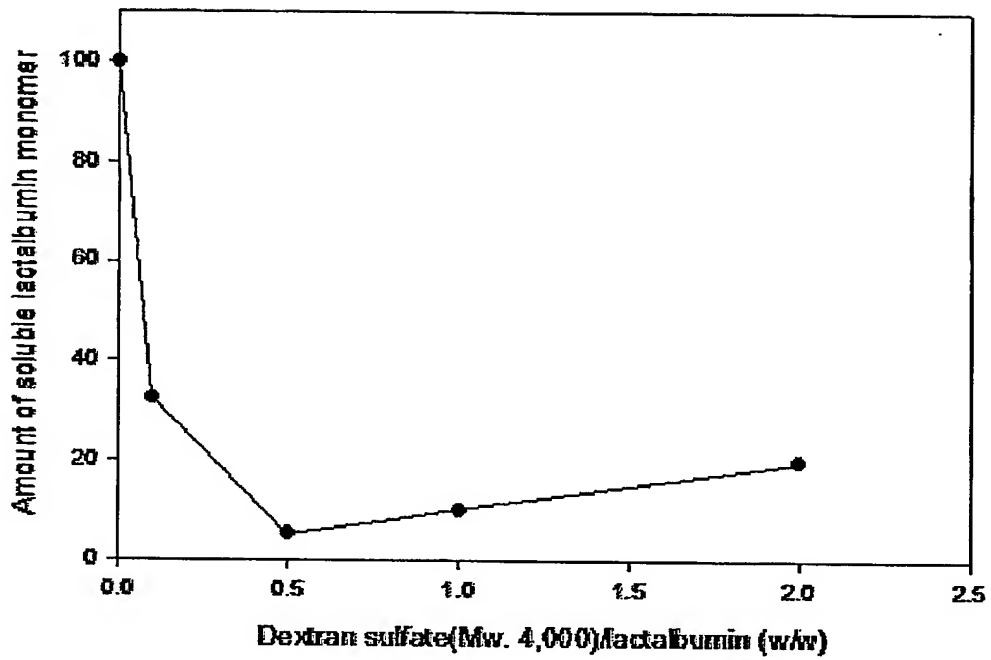
【도 3】



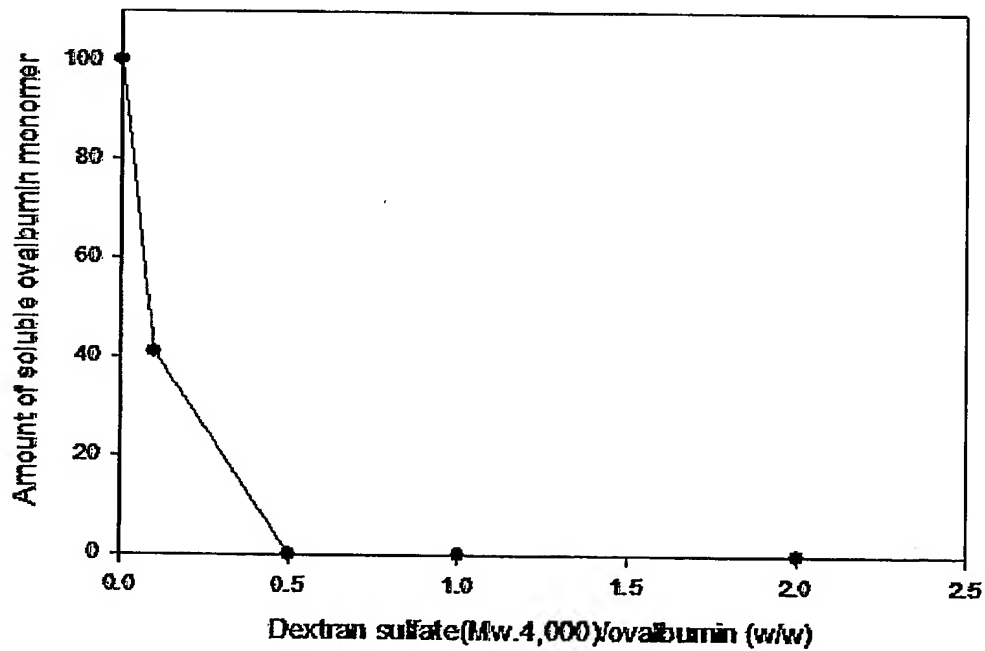
【도 4】



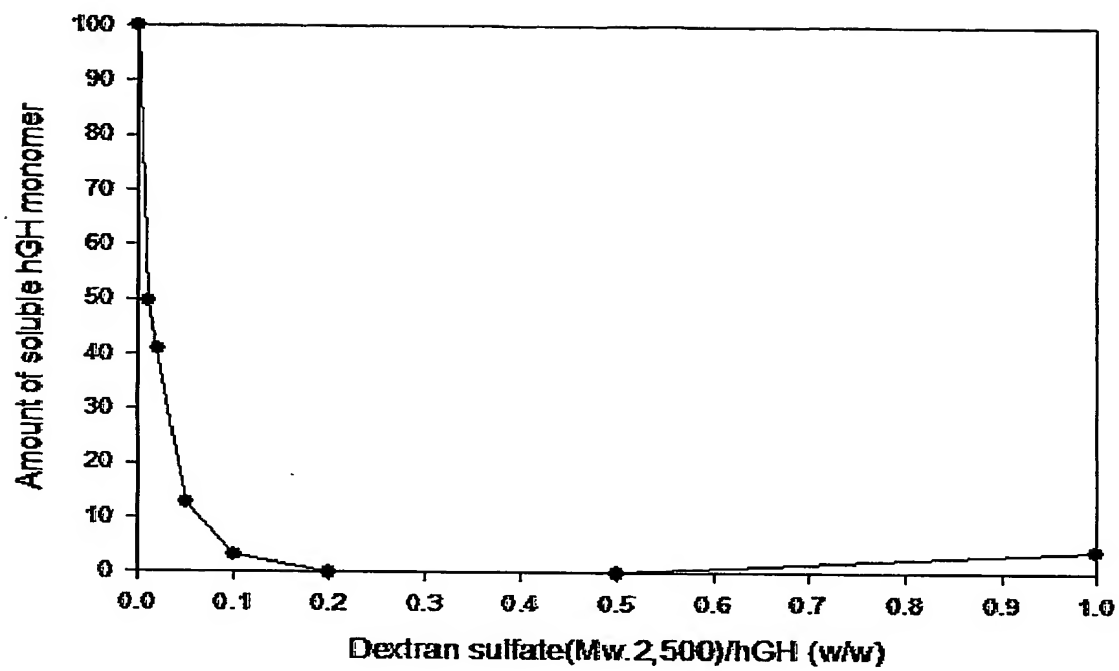
【표 5】



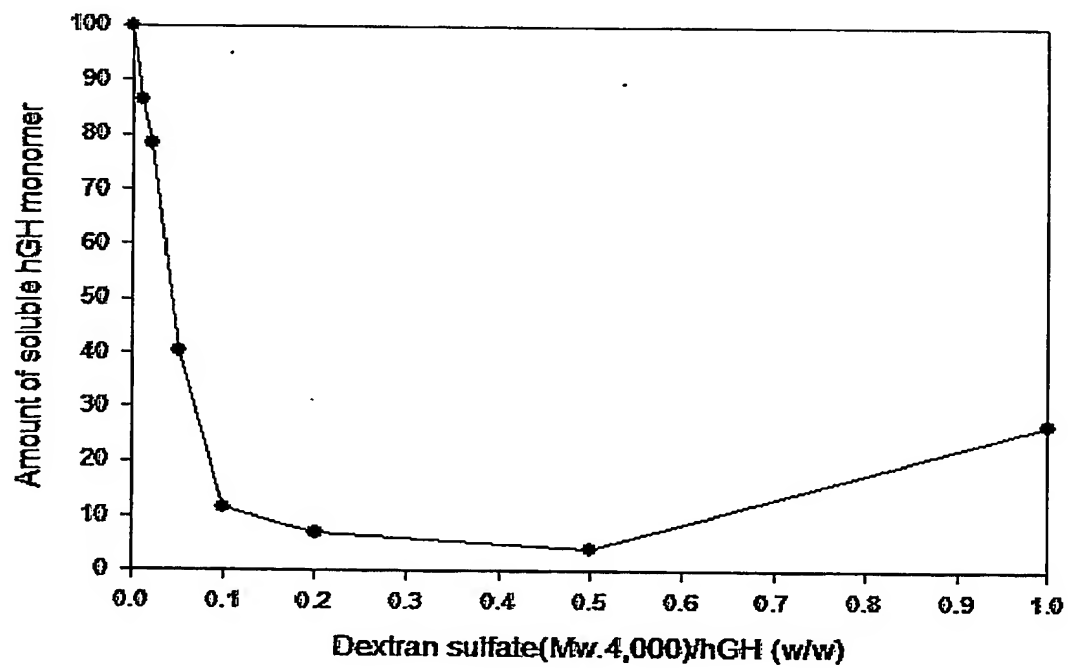
【표 6】



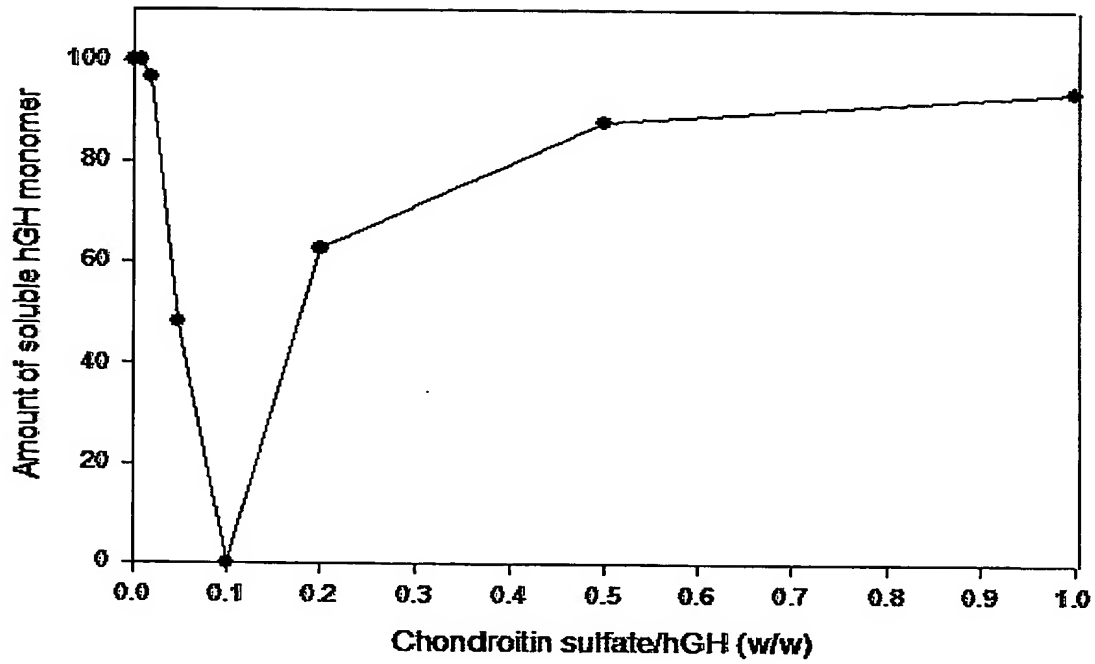
【도 7】



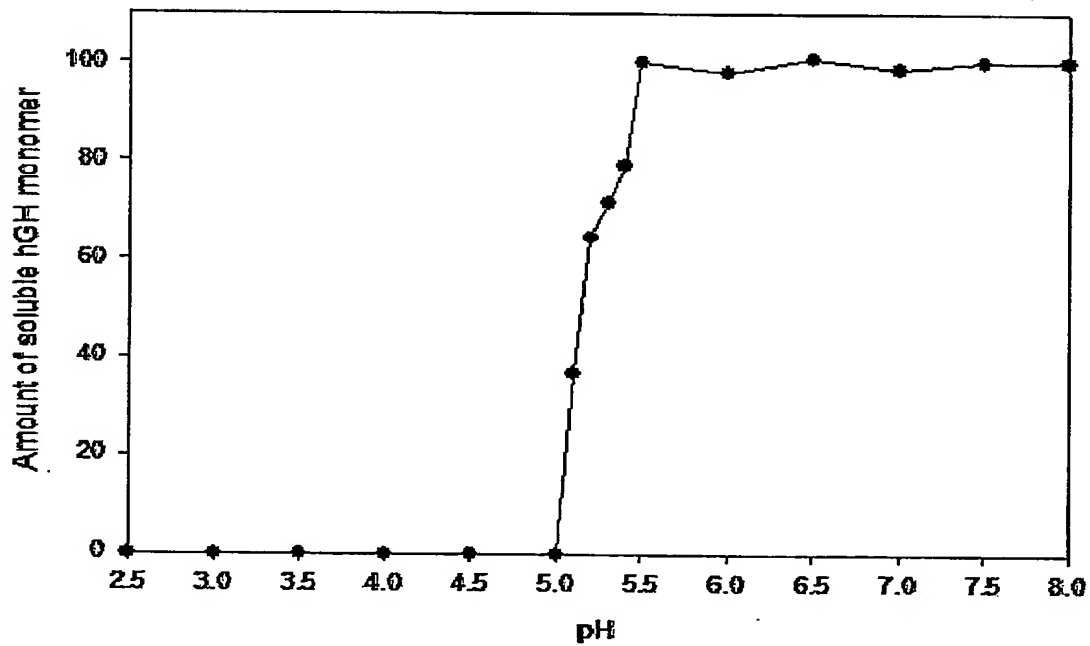
【도 8】



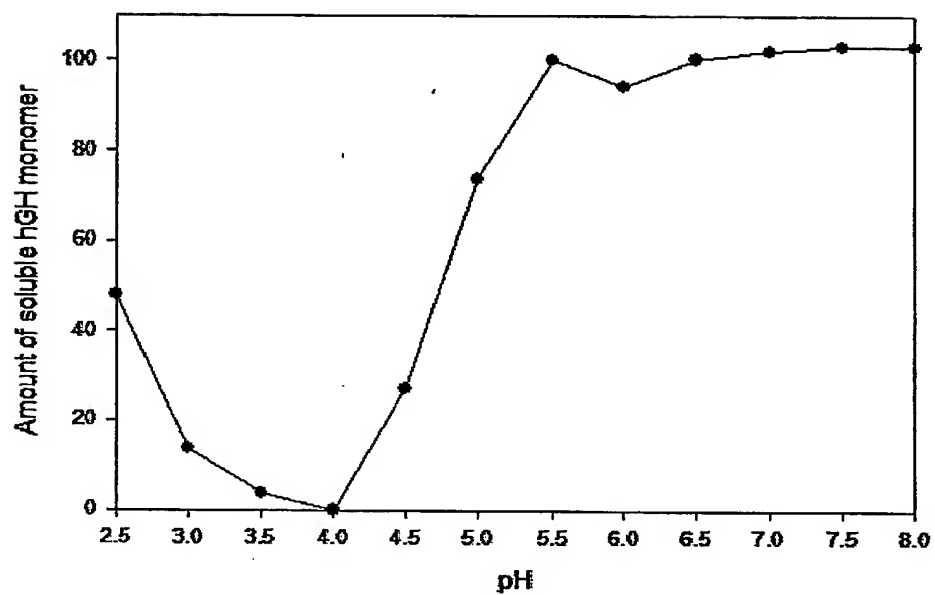
【표 9】



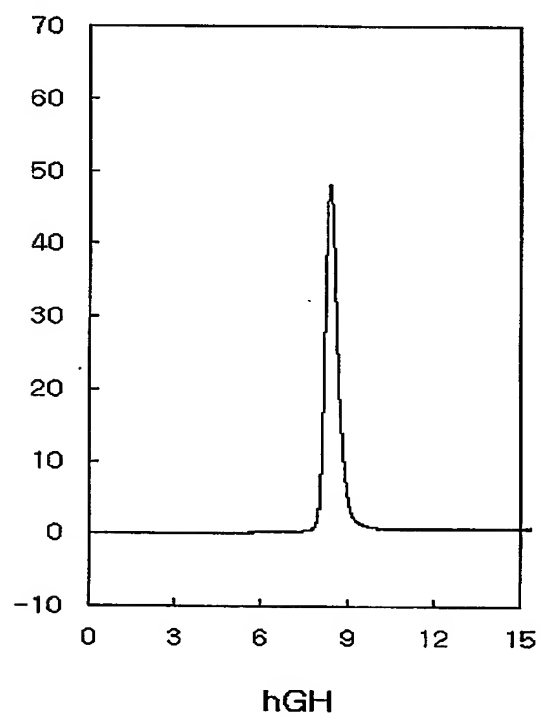
【표 10】



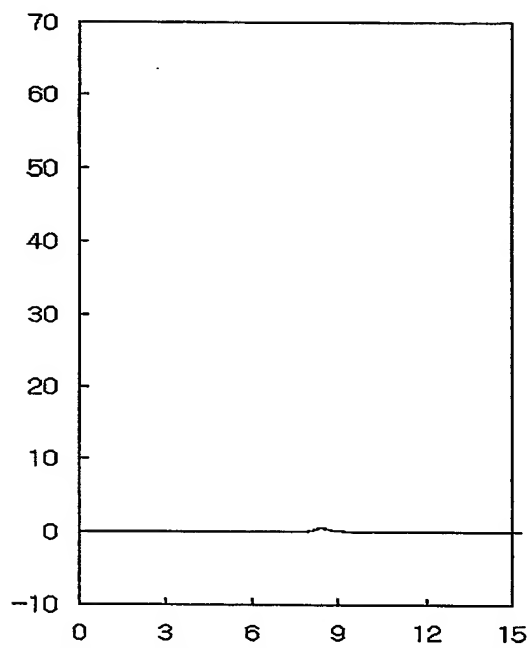
【도 11】



【도 12a】

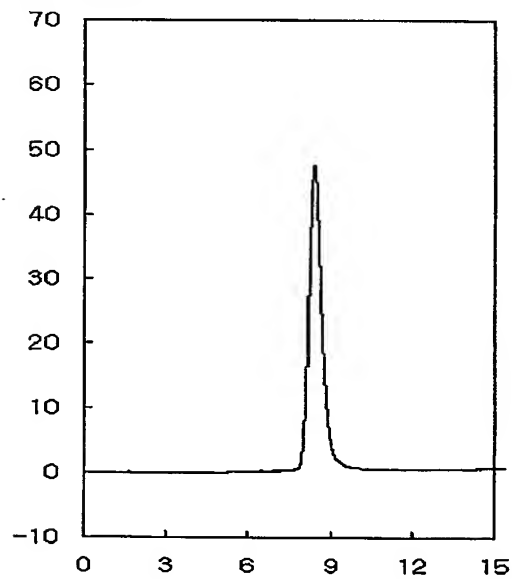


【도 12b】

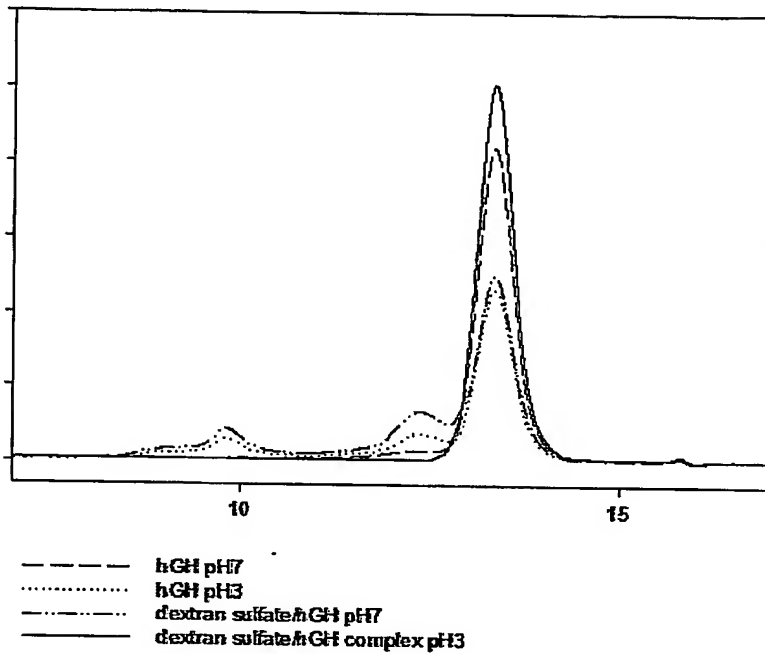


Supernatant of (hGH+Dextran sulfate) at pH 3.0

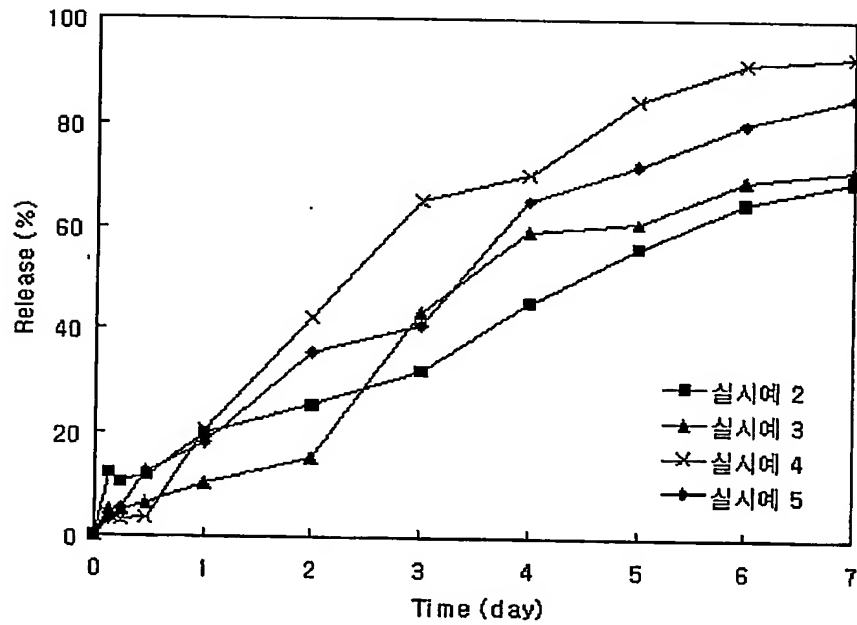
【도 12c】

(hGH+Dextran sulfate) pellet을
pH 7.0에 suspension 후

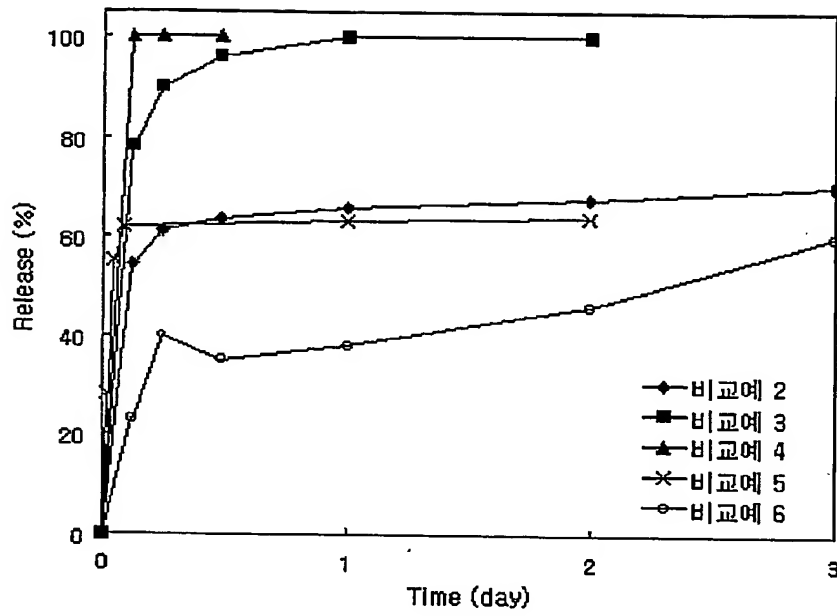
【도 13】



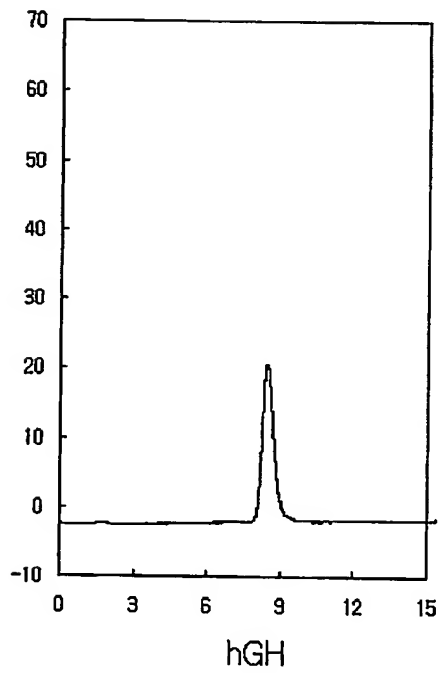
【도 14】



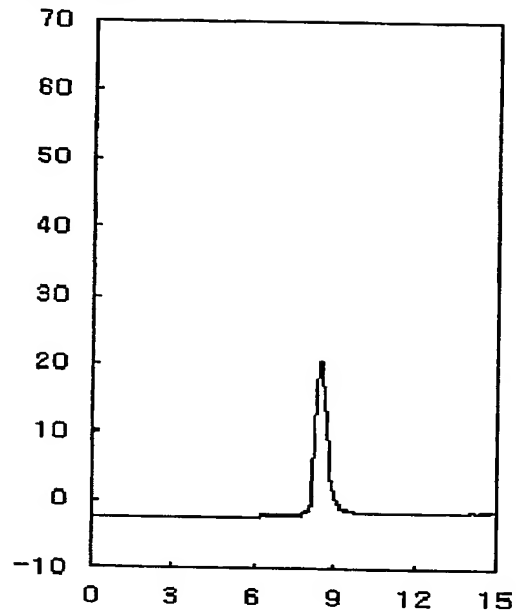
【도 15】



【도 16a】

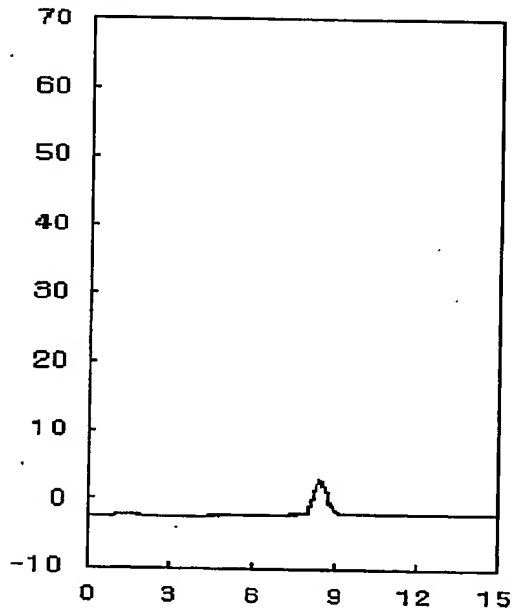


【도 16b】



제조 직후 추출된 hGH

【도 16c】



체 외 방출 시험 5일 후
추출된 hGH